

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Tomáš Garnol

2016

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Doktorský studijní program
Fyziologie a patologická fyziologie**

**Regenerace jater po částečné hepatektomii u potkanů s nealkoholovým ztukovatěním
jater**

**Liver regeneration after partial hepatectomy in rats suffering from non-alcoholic
fatty liver disease**

MUDr. Tomáš Garnol

Školitelka: prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.
Školitel konzultant: Doc. MUDr. Otto Kučera, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Obhajoba dne: 19. 9. 2016

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 8. července 2016

Na tomto místě bych chtěl poděkovat především svým školitelům: Prof. MUDr. Zuzaně Červinkové, CSc. za odborné vedení po celou dobu mého postgraduálního studia, trpělivost, cenné rady a připomínky; Doc. MUDr. Ottovi Kučerovi, Ph.D. za nezměrné úsilí, se kterým mě zasvěcoval do řady laboratorních postupů a za jeho cenné odborné rady a pomoc.

Moje poděkování patří rovněž všem členům výzkumného týmu HepEx, jmenovitě Doc. MUDr. Halce Lotkové, Ph.D., Mgr. Pavle Staňkové, Ph.D., RNDr. René Endlicherovi, Ph.D., Mgr. Marii Vaculové, Janě Ondrákové a Mgr. Pospíšilové, bez jejichž nezištné pomoci by tato práce nemohla vzniknout.

Tato práce vznikla za podpory grantů GAUK 126109; Univerzity Karlovy SVV-2011-262901 a SVV-2013-266901; PRVOUK P37/02.

OBSAH

OBSAH.....	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
1. ÚVOD.....	11
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	13
2.1 Regenerace jater.....	13
2.1.1 Zvířecí modely jaterní regenerace.....	13
2.1.2 Toxické modely jaterní regenerace	14
2.1.2.1 Tetrachlormetan	15
2.1.2.2 D-galaktosamin	15
2.1.2.3 Thioacetamid.....	16
2.1.2.4 Acetaminofen	17
2.1.3 Chirurgické modely jaterní regenerace	18
2.1.3.1 Podvaz větve portální žíly	18
2.1.3.2 Parciální hepatektomie	18
2.1.3.3 Regenerace jater po 2/3 hepatektomii	20
2.1.4 Metody hodnocení intenzity regenerace	31
2.2 Nealkoholové ztukovatění jater	33
2.2.1 Histologické hodnocení nealkoholového ztukovatění jater	35
2.2.2 Etiopatogeneze nealkoholového ztukovatění jater	36
2.2.3 Mitochondriální dysfunkce	38
2.2.4 Oxidační stres.....	39
2.2.5 Změny v produkci cytokinů	40
2.2.6 Modely nealkoholového ztukovatění jater u potkanů	41
2.2.6.1 Nutriční modely nealkoholového ztukovatění jater	42
2.2.6.2 Genetické modely nealkoholového ztukovatění jater	43
2.2.7 Regenerace jater postižených nealkoholovým ztukovatěním	43
3. CÍLE PRÁCE	47
4. METODIKY	48
4.1 Metodiky pokusů <i>in vivo</i>	48
4.1.1 Pokusná zvířata	48
4.1.2 Zavedení modelu nealkoholového ztukovatění jater na potkanech	48

4.1.3	Studium regenerace steatotických jater po 2/3 parciální hepatektomii na potkanech	49
4.1.4	Biochemická vyšetření séra.....	50
4.1.5	Stanovení sérové cytokinů	50
4.1.6	Stanovení respirace izolovaných mitochondrií a jaterního homogenátu	51
4.1.7	Stanovení obsahu redukovaného a oxidovaného glutathionu v jaterním homogenátu.....	51
4.1.8	Stanovení obsahu jaterní DNA.....	52
4.1.9	Stanovení koncentrace proteinů	52
4.1.10	Stanovení obsahu tkáňového malondialdehydu a koncentrace tkáňových cytokinů	52
4.1.11	Stanovení exprese mRNA uncoupling proteinu 2.....	52
4.1.12	Jaterní histologie	53
4.1.13	Stanovení obsahu triacylglycerolů a cholesterolu v játrech	54
4.2	Metodiky pokusů <i>in vitro</i>	54
4.2.1	Pokusná zvířata	54
4.2.2	Izolace hepatocytů potkana	54
4.2.5	Příprava primárních kultur hepatocytů potkana	56
4.2.6	Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy	58
4.2.7	Aktivita buněčných dehydrogenáz	58
4.2.8	Stanovení intracelulárního obsahu redukovaného a oxidovaného glutathionu.....	59
4.2.9	Stanovení produkce reaktivních kyslíkových derivátů	59
4.2.10	Stanovení koncentrace malondialdehydu.....	60
4.2.11	Stanovení produkce albuminu.....	60
4.2.12	Zobrazení mitochondriálního membránového potenciálu	61
4.2.13	Stanovení respirace izolovaných hepatocytů v suspenzi	61
4.3	Statistické vyhodnocení výsledků.....	62
5.	VÝSLEDKY	63
5.1	Výsledky pokusů <i>in vivo</i>	63
5.1.1	Zavedení modelu nealkoholového ztukovatění jater potkana <i>in vivo</i>	63
5.1.1.1	Váhové charakteristiky a příjem diet	63
5.1.1.2	Váhy jater a obsah triacylglycerolu a cholesterolu v játrech	64
5.1.1.3	Markery oxidačního stresu v játrech	65
5.1.1.4	Obsah cytokinů v játrech.....	65
5.1.1.5	Sérové biochemické parametry	66

5.1.1.6	Respirace izolovaných mitochondrií.....	66
5.1.1.7	Expres <i>uncoupling</i> proteinu 2.....	67
5.1.1.8	Histologické změny navozené dietami.....	68
5.1.2	Vliv prosté jaterní steatózy u potkana na regeneraci jater po parciální hepatektomii.....	71
5.1.2.1	Sérové biochemické parametry	71
5.1.2.2	Váhy jater a obsah triacylglycerolu a cholesterolu v játrech	71
5.1.2.3	Redoxní stav jater a lipoperoxidace	72
5.1.2.4	Obsah cytokinů v játrech po parciální hepatektomii.....	73
5.1.2.5	Obsah DNA v játrech po parciální hepatektomii	73
5.1.2.6	Jaterní histologie a inkorporaci bromdeoxyuridinu do DNA hepatocytů po parciální hepatektomii.....	74
5.1.2.7	Respiraci mitochondrií v jaterním homogenátu	76
5.2	Výsledky pokusů <i>in vitro</i>	78
5.2.1	Porovnání účinku terciárního-butyldihydroperoxidu na steatotické a nesteatotické hepatocyty <i>in vitro</i>	78
5.2.1.1	Viabilita steatotických a neztukovatělych hepatocytů potkana	78
5.2.1.2	Produkce reaktivních kyslíkových derivátů v steatotických a neztukovatělych hepatocytech potkana.....	79
5.2.1.3	Produkce albuminu a mitochondriální membránový potenciál u steatotických a neztukovatělych hepatocytů potkana	80
5.2.1.4	Respirace permeabilizovaných steatotických a nesteatotických hepatocytů	81
5.2.1.5	Vliv trifluoperazinu na poškození steatotických a nesteatotických hepatocytů navozené terciárním-butyldihydroperoxidem.....	82
6.	DISKUSE	89
6.1	Zavedení modelu nealkoholové steatózy na potkanech.....	89
6.2	Vliv steatózy na jaterní regeneraci po parciální hepatektomii u potkanů.....	93
6.3	Vliv oxidačního stresu indukovaného terciárním-butyldihydroperoxidem na steatotické hepatocyty potkana v podmínkách <i>in vitro</i>	96
7.	ZÁVĚRY	99
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	100

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAP	2-acetylaminofluoren
ADP	adenosindifosfát
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
APAP	acetaminofen
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
BrdU	bromdeoxyuridin
CCl ₄	tetrachlormetan
cDNA	komplementární DNA
CM-H2DCFDA	5-(-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetát
CT	počítačová tomografie
Cyp2E1	cytochrom P450 2E1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
EGTA	etylenglykol-di-(2-aminoetyleter)-tetraoctová kyselina
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FFAs	volné mastné kyseliny
GalN	D-galaktosamin
GSH	redukováný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion, glutathiondisulfid
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HGF	hepatocytární růstový faktor
HFD	vysokotuková dieta, <i>high-fat diet</i>
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie; <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HSC	hvězdicové (Itovy) buňky – <i>hepatic stellate cells</i>
IL-6	interleukin 6

JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolylkarbokyaninjodid
LAP	laparotomie
LDH	laktátdehydrogenáza
LSEC	endotelové buňky jaterních sinusoid, <i>liver sinusoidal endothelial cells</i>
MCDD	methionin, cholin-deficientní dieta
MDA	malondialdehyd
MFD	dieta se středním obsahem tuků, <i>medium-fat diet</i>
MMP	mitochondriální membránový potenciál
MPT	<i>mitochondrial permeability transition</i>
MPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NAD ⁺	oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
NAFLD	nealkoholové ztukovatění jater, <i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinonimin
NAS	<i>Non-alcoholic fatty liver disease Activity Score</i>
NASH	nealkoholová steatohepatitida, <i>non-alcoholic steatohepatitis</i>
NF-κB	nukleární faktor κB
NS	nesteatotické hepatocyty
n.s.	nesignifikantní
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PHx	parciální hepatektomie
PPARα	<i>peroxisome proliferator-activated receptor α</i>
PS	periportální prostor
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
RCI	index respirační kontroly
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku, <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	reaktivní formy kyslíku, <i>reactive oxygen species</i>
RT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce, <i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
SD	směrodatná odchylka
SH	steatotické hepatocyty

ST-1	standardní laboratorní dieta
STAT-3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TAA	thioacetamid
TAG	triacylglycerol
tBHP	terciární butylhydroperoxid
TFP	trifluoperazin
TGF- α	transformující růstový faktor α
TGF- β	transformující růstový faktor β
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
WST-1	tetrazoliová sůl používaná k určování aktivity buněčných dehydrogenáz (4-(3-(4-iodofenyl)-2-(4nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzen-disulfonát)
uPa	urokinázový aktivátor plazminogenu
UCP	<i>uncoupling protein</i>

1. ÚVOD

Játra jsou důležitým orgánem těla, vykonávají celou řadu nezastupitelných funkcí v intermediárním i energetickém metabolismu, produkují většinu plazmatických proteinů včetně koagulačních faktorů, jsou hlavním místem biotransformace a eliminace xenobiotik i řady látek endogenního původu, jsou místem tvorby žluči, podílejí se na imunitních reakcích organismu, produkují signální molekuly nebo jejich prekurzory (např. erythropoetin, angiotensinogen) a v neposlední řadě vzhledem ke svému unikátnímu krevnímu zásobení významně zasahují i do systémové cirkulace.

Játra jsou, pravděpodobně v důsledku časté expozici látkám s toxickým účinkem, vybavena ohromující, evolučně dobře konzervovanou schopností obnovit původní populaci jaterních buněk po jejich redukci nebo poškození různé etiologie. Tato schopnost je tradičně nazývána jaterní regenerací, i když se v pravém slova smyslu o regeneraci orgánu nejedná, nedochází k rekonstrukci původních jaterních laloků. Na obnově funkce i populace jaterních buněk se podílí jak hypertrofie zbylých jaterních buněk, tak také jaterní hyperplasie (Bucher 1991).

Nealkoholové ztukovatění jater (NAFLD – non-alcoholic fatty liver disease) je v současné době jedním z nejčastějších chronických onemocnění jater v ekonomicky vyspělých zemích, prevalence činí u západní populace kolem 30 % (Bellentani *et al.* 2010). Předpokládá se, a existuje pro to řada důkazů, že NAFLD je jaterním komponentem metabolického syndromu (Vernon *et al.* 2011). Jako NAFLD označujeme stav, kdy je více než 5 % hepatocytů postiženo steatózou (Brunt *et al.* 2011).

Resekce jater z různých příčin (primární nebo metastatické tumory jater, štěpy jater od živých dárců pro transplantaci, aj.) je v současnosti běžnou součástí klinické praxe. Úspěšné zotavení a obnova jaterních funkcí závisí na regenerační schopnosti zbytku jater. Průběh regenerace jater může být velmi významně ovlivněn současným postižením jater patologickým procesem, přičemž vzhledem k častému výskytu NAFLD je steatotické poškození jater jednou z nejčastějších příčin, která může negativně ovlivnit průběh regenerace jater po parciální resekcii nebo regeneraci steatotického štěpu po transplantaci (Behrns *et al.* 1998, McCormack *et al.* 2007). V literatuře je popsáno několik studií zaměřených na sledování regenerace jater postižených steatózou se značně rozporupnými výsledky. Někteří dokladují snížení regenerační odpovědi a funkční obnovy tkáně u jater postižených NAFLD v experimentu i v klinické praxi (Vetelainen *et al.* 2007a, Kele *et al.*

2013), zatímco jiní autoři nezaznamenali signifikantní postižení regenerační odpovědi steatotických jater u potkanů po částečné hepatektomii (Picard *et al.* 2002, Sydor *et al.* 2013). Obdobně, Cho a spoluautoři tvrdí, že mírná steatóza není zásadním rizikovým faktorem pro částečnou hepatektomii a nesnižuje regenerační odpověď štěpu živých dárců (Cho *et al.* 2006). Příčinou této nejednotnosti výsledků jsou bezpochyby různé experimentální podmínky v pokuse na zvířeti i rozdílný klinický stav pacientů. Významnou roli jistě hraje míra i způsob navození jaterní steatózy, experimentální model indukující regenerační odpověď, přidružené choroby a další faktory. Cílem této práce bylo studium časně fáze regenerace jater po částečné hepatektomii u potkanů s nutričně navozenou prostou steatózou.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Regenerace jater

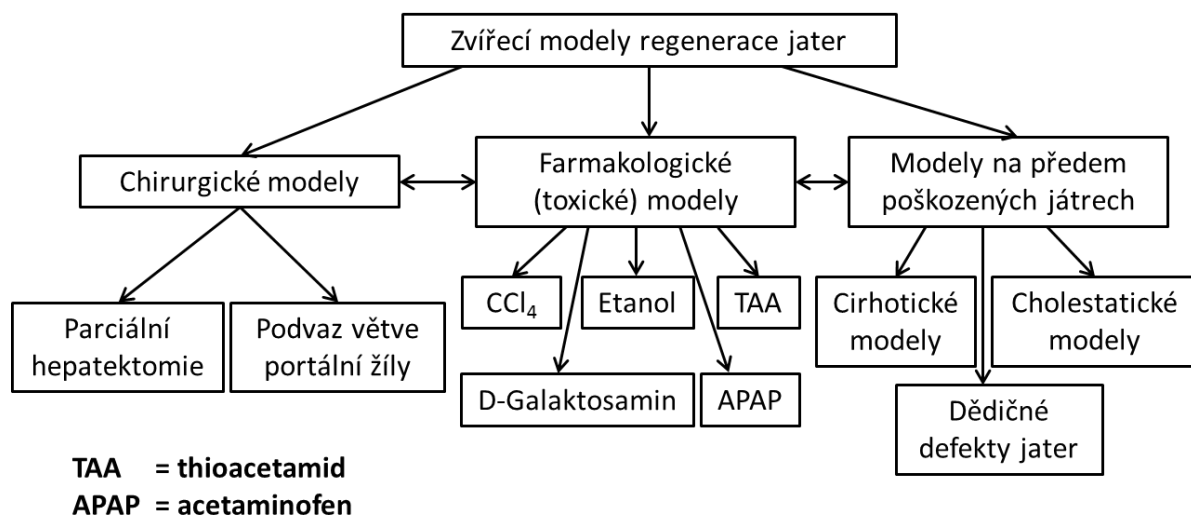
První zmínky o udivující schopnosti jater regenerovat nalézáme již v řecké mytologii v báji o Prométheovi. Prométheus byl potrestán za to, že ukradl bohům oheň a dal ho lidem. Zeus ho nechal přikovat ke skále v pohoří Kavkaz a poslal orla Ethona, který Prometheovi každý večer kloval játra, ta mu pak do druhého dne dorůstala.

Ačkoliv se nepoškozené hepatocyty dospělého jedince dělí jen výjimečně, na 20 000 hepatocytů v klidové G₀ fázi připadá 1 buňka nacházející se v mitotickém dělení (Steer 1995), v odpovědi na redukci jaterní tkáně parciální hepatektomií nebo v důsledku toxického nebo virového poškození jater dochází k masivní proliferaci jaterních buněk a následné obnově funkční jaterní tkáně (Michalopoulos and DeFrances 1997, Fausto and Riehle 2005). V játrech se nacházejí různé typy buněk, jsou to především vlastní parenchymové buňky - hepatocyty, které tvoří asi 80 % celkové hmotnosti jater a představují cca 70 % buněčné populace jaterní tkáně. V játrech jsou však také neparenchymové buňky, mezi které řadíme endotelové buňky jaterních sinusoid (LSEC), endotelové buňky krevních cév (vény, venuly, arterie a arterioly), epitelové buňky žlučových cest - cholangiocyty, Kupfferovy buňky patřící mezi tkáňové makrofágy, Itovy buňky (hvězdicové buňky - HSC) a Pit buňky – velké granulární lymfocyty specifické pro játra, které řadíme mezi *natural killer cells* (Si-Tayeb et al. 2010). Regenerační odpověď je do značné míry závislá na typu inzultu, který vedl k redukci funkční jaterní tkáně a který následně indukoval reparační procesy.

2.1.1 Zvířecí modely jaterní regenerace

Studium regenerace jater u člověka významně omezují etické důvody, ale také značně heterogenní etiologie jaterních lézí, které regeneraci mohou indukovat. Proto je nezbytné studovat proces jaterní regenerace na standardizovaných experimentálních modelech. *In vitro* modely jsou vhodné pro zkoumání jednotlivých signálů v regulačních drahách, např. pro studium signálních molekul s mitogenním účinkem na hepatocyty. Vzhledem ke komplexní souhře mezi jednotlivými populacemi jaterních buněk v průběhu regenerace je nutné výsledky pokusů *in vitro* vždy validovat v podmínkách *in vivo* na celém zvířeti. Experimentální modely, které se využívají ke studiu regenerace jater, jsou shrnuty na obrázku č. 1 (Palmes and Spiegel 2004). Velká rozmanitost je i ve volbě

pokusných zvířat, a to od malých hlodavců až po velké savce jako je prase. Volba pokusného zvířete závisí především na výzkumném problému, který chceme řešit. Nejčastěji se ke studiu používají laboratorní potkani a myši s ohledem na finanční, logistické a do určité míry i etické důvody. Díky dostupnosti geneticky modifikovaných zvířat a dobré dostupnosti velkého množství metodických postupů lze na malých laboratorních zvířatech studovat jednotlivé patogenetické procesy podílející se na regeneraci jater. Nicméně, použitelnost výsledků získaných na malých laboratorních zvířatech u člověka je značně diskutabilní. Velká zvířata, jako jsou prasata, ovce popř. psi jsou vhodná pokusná zvířata v situaci, kdy řešíme otázky důležité pro klinickou praxi. Jejich širšímu využití pro studium regenerace jater brání jejich finanční náročnost, metodické limity a v neposlední řadě i etické problémy.



Obrázek č. 1. - Zvířecí modely regenerace jater
upraveno podle (Palmes and Spiegel 2004)

2.1.2 Toxické modely jaterní regenerace

Poškození jater lze indukovat celou řadou toxických látek. Na rozdíl od částečné hepatektomie, kdy zůstávají zbylé hepatocyty nepoškozené, použitím modelových hepatotoxinů lze navodit selektivní poškození jater v centrilobulární nebo periportální oblasti, případně postižení difuzní, což umožňuje napodobit některá jaterní onemocnění. Úskalí tohoto přístupu spočívá v nižší reprodukovatelnosti a standardizaci modelu, protože výsledné toxické poškození je závislé na řadě faktorů, jako je pohlaví, věk, způsob podání

toxické látky, nutriční stav a další. Navíc, hepatotoxické látky mohou přímo interferovat s buněčnými a molekulárními mechanismy regenerace jater, jako je poškození buněčných membrán (vede k narušení interakce mezi růstovými faktory a membránovými receptory), změny v genové expresi a následné syntézy proteinů, zánětlivá reakce v odpovědi na zvýšenou tvorbu cytokinů a kyslíkových radikálů nebo aktivace neparenchymových buněk.

2.1.2.1 Tetrachlormetan

Tetrachlormetan (CCl_4) je těkavá anorganická látka s dobře prokázaným hepatotoxickým účinkem. CCl_4 je metabolizován především cytochromem P450 2E1 (Cyp2E1) za vzniku vysoce reaktivních metabolitů, především trichlormetylových radikálů ($\text{CCl}_3\cdot$) a trichlormetylperoxy radikálů ($\text{CCl}_3(\text{X})\cdot$). Tyto radikály iniciují lipoperoxidaci a vedou k hepatocelulárnímu poškození především membrán. Vzhledem k tomu, že nejvyšší aktivita cytochromů P450 je v centrilobulární části jaterního lalůčku (zóna 3), je i nejvyšší koncentrace reaktivních radikálů v této oblasti, a proto CCl_4 způsobuje závažné centrilobulární nekrózy (Weber *et al.* 2003). Hepatotoxický účinek CCl_4 lze potencovat současným nebo předchozím podáním fenobarbitalu, který indukuje aktivitu cytochromů P450 v játrech, což vede k rychlejší tvorbě reaktivních metabolitů odpovědných za toxický účinek (Moody *et al.* 1990). Bylo prokázáno, že CCl_4 může kromě nekrózy vyvolat také apoptózu hepatocytů (Shi *et al.* 1998). Tetrachlormetanem indukované poškození jater je provázáno vzestupem koncentrace některých cytokinů, především tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α), ten se však pravděpodobně přímo nepodílí na toxickém účinku tetrachlormetanu, svými prozánětlivými účinky však přispívá k rozvoji zánětu a následné fibrózy při chronickém podávání tohoto hepatotoxinu (Simeonova *et al.* 2001).

2.1.2.2 D-galaktosamin

D-galaktosamin (GalN) je účinná hepatotoxická látka vyvolávající panlobulární nekrózy hepatocytů, infiltraci neutrofilními granulocyty a zvýšení počtu Kupfferových buněk v játrech. Obraz poškození jater GalN připomíná virovou hepatitidu (Decker and Keppler 1974, Rodriguez *et al.* 1997). Mechanismy, které indukují poškození jater GalN, zahrnují řadu metabolických poruch vedoucích k depleci uridinových nukleotidů s následnou inhibicí tvorby RNA a syntézy proteinů (Stachlewitz *et al.* 1999). Bylo

prokázáno, že toxicita GalN je způsobena neschopností buněk syntetizovat významné komponenty buněčných membrán s následkem buněčné smrti. Tyto závěry potvrzují studie, které prokázaly protektivní účinek vůči toxickému účinku GalN suplementací uridinů (Holstege *et al.* 1981). GalN-indukovaná inhibice syntézy proteinů je následně provázena zvýšeným oxidačním stresem, deplecí redukovaného glutathionu a mitochondriální dysfunkcí (McMillan and Jollow 1992, Ranchal *et al.* 2006). Nicméně, řada studií dokladuje, že se na výsledném toxickém účinku GalN podílejí také extrahepatální faktory, například zvýšená permeabilita střeva provázená zvýšenou přítomností bakterií a endotoxinu v portální krvi, což vede k aktivaci Kupfferových buněk a uvolnění TNF α (Kasravi *et al.* 1996, Chung *et al.* 2006). Na výsledném cytotoxickém působení GalN se podílejí rovněž lipoperoxidace, zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS, *reactive oxygen species*) a porucha intracelulární homeostázy kalcia, v podmínkách *in vitro* byla prokázána aktivace nukleárního faktoru κ B (NF- κ B) s následnou aktivací exprese indukibilní syntázy oxidu dusnatého a zvýšenou tvorbou NO (Siendones *et al.* 2004). Tyto změny mohou indukovat apoptózu.

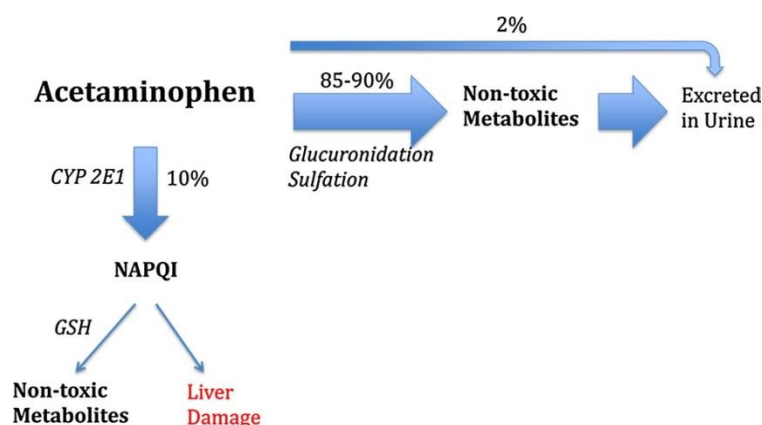
2.1.2.3 Thioacetamid

Hepatotoxický účinek thioacetamidu (TAA) byl rozpoznán brzy po jeho zavedení k průmyslovému použití, poprvé na jeho toxické účinky poukázali již v roce 1948 (Fitzhugh and Nelson 1948). V šedesátých letech minulého století bylo jeho používání zakázáno a od té doby se datuje také jeho využití jako modelové hepatotoxické látky. Patří mezi oblíbené modelové látky vzhledem k tomu, že je velmi dobře rozpustný ve vodě a poskytuje širokou škálu jaterního poškození. Jedna dávka TAA způsobuje akutní centrilobulární nekrózu s následnou regenerační odpovědí (Mangipudy *et al.* 1995), subchronická expozice vede k fibróze nebo cirhóze jater (Low *et al.* 2004) a dlouhodobé podávání indukuje rozvoj hepatocelulárního karcinomu (Yang *et al.* 2010, De Minicis *et al.* 2013). Výhodou TAA je vysoká specifita účinku, selektivně postihuje jaterní tkáň; navíc je poměrně dlouhý časový interval mezi nekrotickým působením a jaterním selháním, což poskytuje prostor pro studium mechanismu účinku (Mehendale 2005). TAA vyvolává centrilobulární nekrózu, v hepatocytech dochází k bioaktivaci TAA systémem smíšených funkčních oxidáz, především Cyp2E1, tato metabolická aktivace vede k tvorbě reaktivních sulfinových a sulfonových metabolitů (Chilakapati *et al.* 2005) a obdobně jako

v případě CCl_4 tak vzniká nejvíce reaktivních metabolitů ve 3. zóně jaterního acinu, kde je aktivita cytochromů P450 nejvyšší.

2.1.2.4 Acetaminofen

Acetaminofen (APAP, paracetamol) je široce používaný lék pro své analgetické a antipyretické účinky, je relativně bezpečný pokud se používá v doporučených farmakologických dávkách. Nicméně předávkování APAP je v současnosti nejčastější příčinou akutního jaterního selhání v USA a Velké Británii a incidence se neustále zvyšuje (Bunchorntavakul and Reddy 2013, Michaut *et al.* 2014). Při běžném dávkování je 85-90 % APAP metabolizováno konjugací s endogenními ligandy – s kyselinou glukuronovou nebo sírovou a po té vyloučeno do moči, jen asi 2 % APAP je vyloučeno močí v nezměněné podobě (Lancaster *et al.* 2015). Méně než 10 % APAP podléhá biotransformaci systémem cytochromů P450, opět především Cyp2E1, za vzniku vysoce reaktivního metabolitu N-acetyl-p-benzochinoniminu (NAPQI), který je značně hepatotoxický. Za normálních okolností je NAPQI rychle biotransformován konjugací s redukováným glutathionem (GSH) za vzniku netoxického konjugátu, který je následně vyloučen do žluči (Jaeschke *et al.* 2013). Za situace, kdy dochází k depleci GSH, jako je tomu např. při předávkování APAP, chronické konzumaci alkoholu nebo malnutrici, stoupá koncentrace NAPQI s následným poškozením jater (Jaeschke *et al.* 2012, Jaeschke *et al.* 2013) (obr. č. 2).



Obrázek č. 2. - Metabolismus acetaminofenu

NAPQI - N-acetyl-p-benzochinonimin; GSH – glutathion
(Bunchorntavakul and Reddy 2013)

Významným cílem toxického účinku NAPQI jsou mitochondrie, mitochondriální proteiny vytvářejí addukty s NAPQI, to vede k oxidačnímu stresu ze zvýšené tvorby ROS v mitochondriích, následnému poškození mitochondriální DNA, otevření mitochondriálního póru přechodné permeability (MPTP - *mitochondrial permeability transition pore*) a omezení tvorby ATP (McGill *et al.* 2012a, McGill *et al.* 2012b). Jsou aktivovány Kupfferovy buňky, což může významně ovlivnit také následné reparační procesy (Ju *et al.* 2002).

2.1.3 Chirurgické modely jaterní regenerace

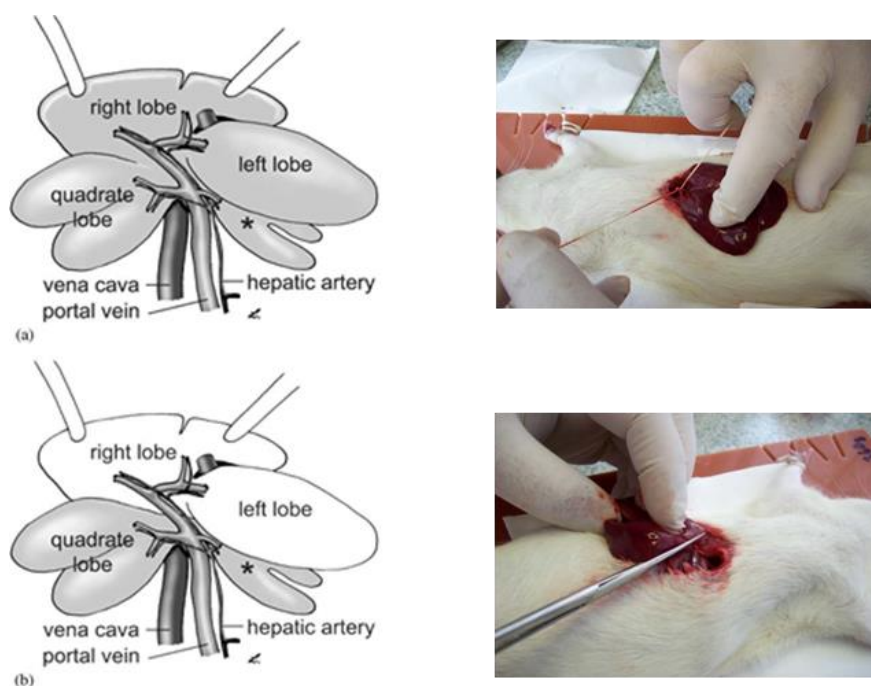
2.1.3.1 Podvaz větve portální žíly

První zmínka o indukci regenerační odpovědi jater při omezení přítoku portální krve se datuje do roku 1861, kdy německý patolog Friedrich Theodor von Frerichs pozoroval, že u pacientů se syfilitickou obliterací jedné větve portální žíly dochází k atrofii příslušného jaterního laloku, zatímco u zbylých laloků zaznamenal zvětšení. Experimentální studie provedené na různých pokusných zvířatech potvrdily, že po ligaci portální větve dochází k atrofii jaterního laloku zásobeného z podvázané větve *v. portae*, kompenzatorní hypertrofie zbylých laloků vedla k obnově jaterní tkáně, míra atrofie i následné reparační odpovědi byla velmi rozdílná (Rous and Larimore 1920, Bax *et al.* 1956, Weinbren and Tarsh 1964). Výsledky studií byly značně rozporuplné, závislé na konkrétním postupu a volbě pokusného zvířete, reprodukovatelnost byla velmi malá. Rozga a spolupracovníci se rozhodli evaluovat tento model za standardních podmínek, optimalizovali operační techniky a podařilo se jim zavést dobře reprodukovatelný postup, kdy kompenzatorní hypertrofie je úměrná míře omezení průtoku portální krve částí jater (Rozga *et al.* 1986). Existují i další modely chirurgických zákroků, které mohou indukovat regenerační odpověď, např. portosystémové zkratky. Jejich přehled od historických počátků až po moderní postupy uvádí Mortensen a Revhaug (Mortensen and Revhaug 2011).

2.1.3.2 Parciální hepatektomie

Nejčastěji používaným modelem pro studium regenerace jater je chirurgické odstranění části jater - parciální hepatektomie. Průkopníky v této oblasti byli Higgins a

Anderson, kteří již v roce 1931 zavedli model 2/3 parciální hepatektomie (PHx) u potkana spočívající v odstranění středního a levého laterálního laloku (obr. č. 3), jejichž hmotnost představuje cca 68 % jaterní tkáně (Higgins and Anderson 1931). Jedná se o poměrně jednoduchý, několik minut trvající chirurgický zákrok, který je pokusnými zvířaty dobře tolerován. Na rozdíl od toxických modelů regenerace jater provázených různou mírou poškození residuálních hepatocytů, po PHx zbylé hepatocyty nepodléhají nekróze (Michalopoulos 2010). Při vlastním chirurgickém zákroku je nutné dbát na to, aby při odstrižení jaterních laloků zůstal v dutině břišní co nejmenší pahýl, přítomnost většího množství nekrotické tkáně může významně ovlivnit průběh regenerační odpovědi (Bucher 1991). Další výhodou je přesné určení doby působení regeneračního stimulu, odstranění části jater je chvíle, od kdy dochází k iniciaci regenerační odpovědi (Michalopoulos 2007).



Obrázek č. 3 - Chirurgický model parciální hepatektomie u potkana
a) anatomie jater potkana; b) 2/3 parciální hepatektomie
upraveno podle (Palmes and Spiegel 2004)

Laločnaté uspořádání savčích jater umožňuje provedení částečné hepatektomie různého rozsahu. Nejčastěji se využívá model 2/3 PHx, odstranění menší části jaterní tkáně (30 % popř. 50 %) je u potkana nebo myši méně vydatným stimulem a následná proliferace jaterních buněk je méně intenzivní (Bucher and Swaffield 1964, Fausto 2001). Subtotální hepatektomie, představující odstranění 90 % jaterní tkáně je natolik závažným zásahem, že

může vést k akutnímu jaternímu selhání (Lehmann *et al.* 2012). Na patogenezi akutního jaterního selhání a omezení regenerační odpovědi u rozsáhlé PHx se podílí významný vzestup průtoku portální krve játry, to vede ke zvýšení smykového napětí (*shear stress*) s následným poškozením endoteliálních buněk jaterních sinusoid a aktivací Kupfferových buněk (Martins *et al.* 2008).

2.1.3.3 Regenerace jater po 2/3 hepatektomii

Nejčastějším modelem pro studium regenerace jater je 2/3 PHx, nejčastěji používaným experimentálním zvířetem jsou malí laboratorní hlodavci. Zatímco většina studií, které následovaly po zavedení modelu PHx Higginsem a Andersonem, byla provedena na laboratorních potkanech, v současnosti je řada prací, které využívají myši ke studiu regenerace jater. Důvodem je mnohem širší nabídka geneticky modifikovaných myší a dostupnost většího množství metodických postupů (Cressman *et al.* 1996, Jia 2011).

Po 2/3 PHx u potkana začíná replikace DNA za 12-16 hodin po chirurgickém zákroku. Hmotnost jaterního zbytku se zvyšuje, a to tak, že za 24 hodin po PHx dosahuje přibližně 45 % a za 48 hodin 70 % původní hmotnosti jater (obr. č. 4). Mezi 7. a 14. dnem po operaci dosahuje objem jater 93% původní hodnoty a uvádí se, že ke kompletní obnově dochází kolem 20. dne po PHx (Higgins and Anderson 1931), i když naše vlastní zkušenosti ukazují, že ani za 3 týdny po 2/3 PHx u potkana játra nedosáhnou původní relativní hmotnosti. Zajímavá data, týkající se velikosti regenerujících jater, poskytla studie na skupině 109 lidských živých donorů jaterního štěpu. Průběh regenerace byl hodnocen CT volumetrií a bylo zjištěno, že pouze 26 dárců dosáhlo za 6 měsíců po operaci původního objemu, průměrná hodnota činila 91 %. Zajímavé je, že byl signifikantní rozdíl v závislosti na pohlaví, zatímco u mužů dosáhla hodnota za 6 měsíců po operaci 92 %, u žen tato hodnota činila pouze 89 % (Ibrahim *et al.* 2005).

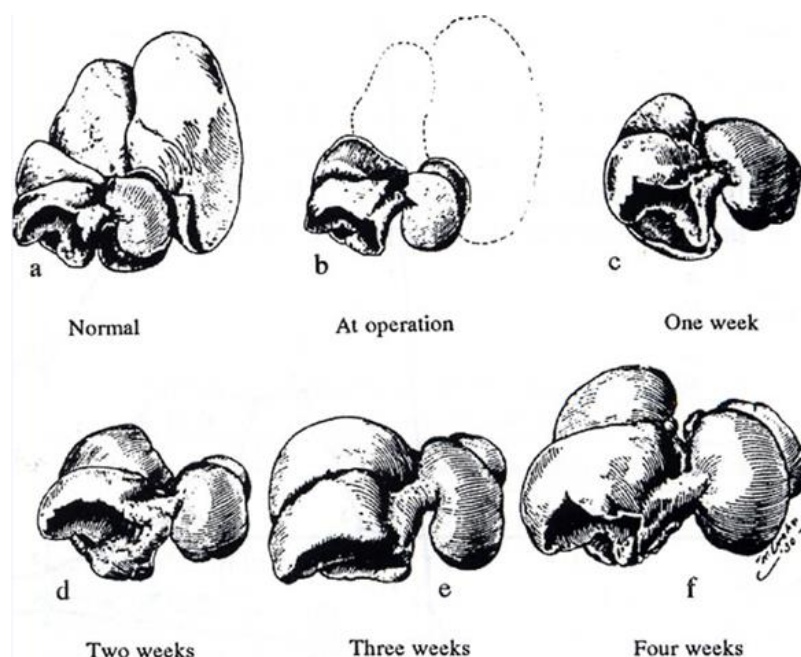
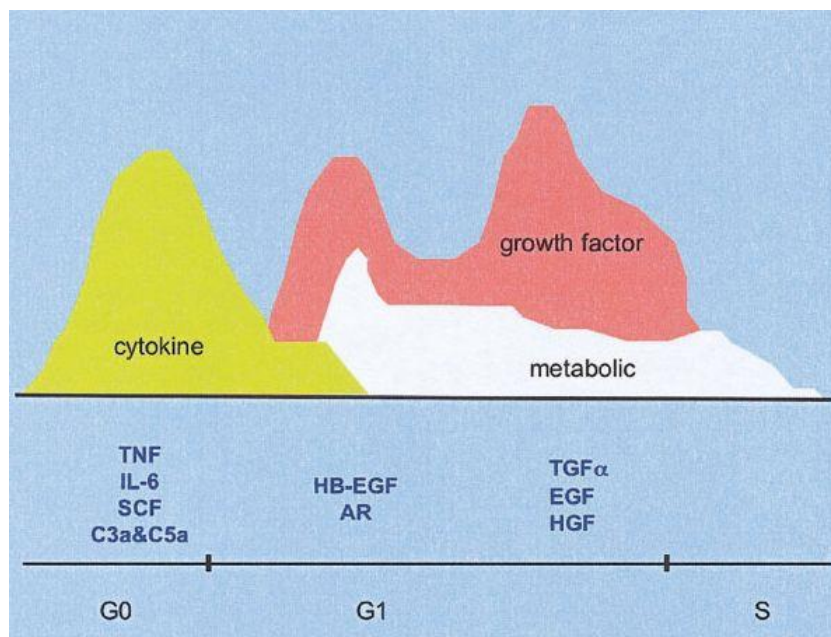


FIG. 3. Liver regeneration after partial hepatectomy. Liver of a normal rat at operation (the excised lobes are outlined) and at 1 to 4 weeks after partial hepatectomy.

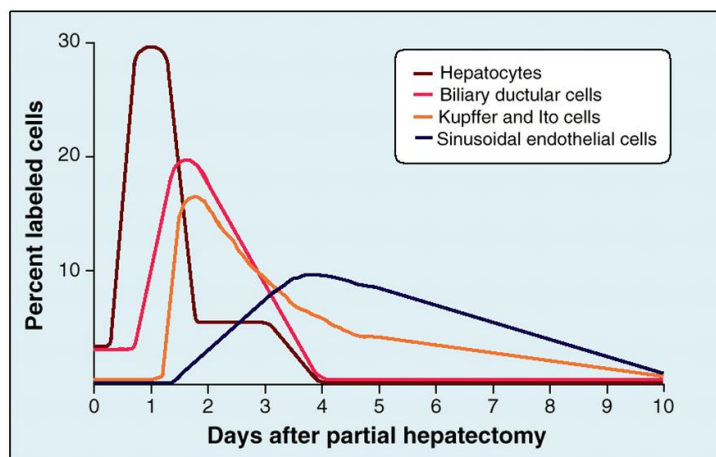
Obrázek č. 4. - Regenerace jater po 2/3 parciální hepatektomii
z originálního článku (Higgins and Anderson 1931)

Přestože studiu regenerace jater po PHx je kontinuálně od 30. let minulého století věnována značná pozornost, v biomedicínských databázích lze dohledat více než 7 000 prací, nejsou dosud plně objasněny přesné mechanismy tohoto procesu. Plně diferencované hepatocyty, které se nacházejí v klidové G_0 fázi, vstupují synchronně do buněčného cyklu a dělí se v průměru 1,6 x. Teorie o mechanismech řídících regeneraci jater se vyvíjely. Hemodynamická teorie klade velký důraz na zvýšení průtoku krve játry a zvýšení krevního tlaku po PHx. Humorální teorie předpokládaly existenci látek jaterního i extrahepatálního původu, které endokrinně, parakrinně, popř. autokrinně stimulují nebo inhibují proliferační procesy. V současné době je obecně přijímána teorie, že regenerace jater je regulována vzájemnou souhrou 3 systémů – cytokiny, růstové faktory a metabolické změny provázející redukci jaterní tkáně (Fausto *et al.* 2006) (obr. č. 5).



Obrázek č. 5. - Řízení regenerace jater souhrou 3 systémů – cytokiny, růstové faktory a metabolické změny.
(Fausto *et al.* 2006).

Na regeneraci jater se podílejí všechny typy jaterních buněk, hepatocyty jsou však první z jaterních buněk, které prolifерují. Řada faktorů, jako je diurnální rytmus, nutrice, a další, ovlivňuje trvání intervalu mezi PHx a iniciací syntézy DNA v hepatocytech, průměrná doba u potkana činí kolem 12 hodin. První vrchol syntézy DNA v hepatocytech je za 24 hodin po PHx, další mnohem menší vrchol lze detegovat mezi 36 a 48 hodinou po PHx (Michalopoulos and DeFrances 1997), mitóza následuje syntézu DNA za 6-8 hodin. Proliferace hepatocytů začíná v periportální oblasti (v první zóně jaterního acinu), proliferace v pericentrální části lobulu je opožděná s maximem za 36 – 48 hodin po PHx. Jak je patrné z obrázku č. 6, u ostatních jaterních buněk dochází ke stimulaci syntézy DNA s přibližně 24 hodinovým zpožděním, u některých i déle (Michalopoulos and DeFrances 1997).



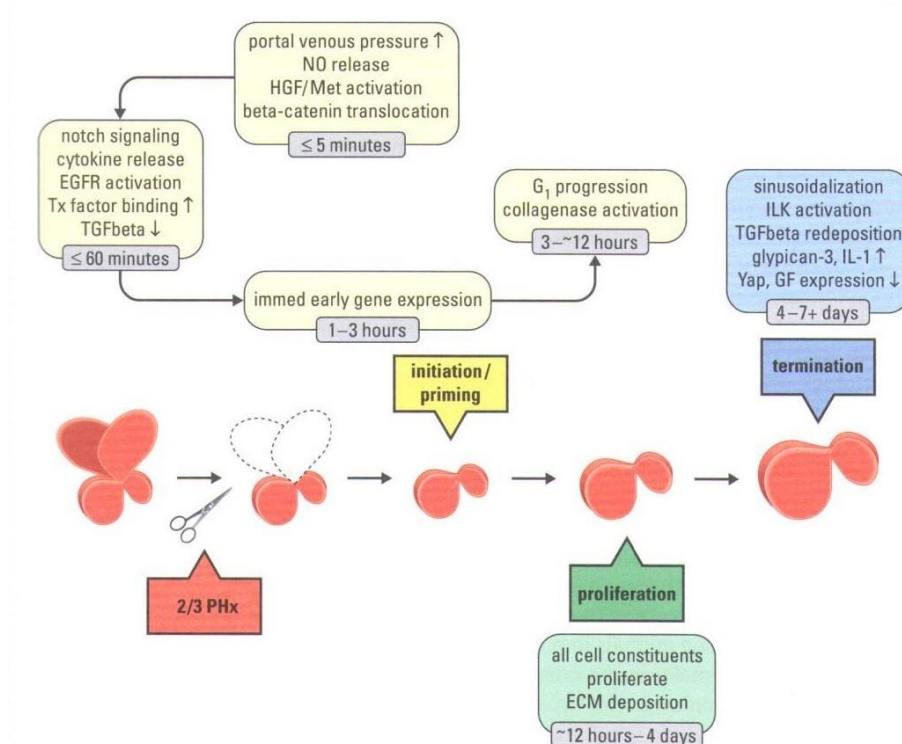
Obrázek č. 6. - Kinetika DNA syntézy v různých typech jaterních buněk po PHx (Michalopoulos and DeFrances 1997)

Děje v průběhu buněčného cyklu po PHx dělíme na 3 fáze (obr. č. 7):

Iniciace (*priming*) – období, kdy většina hepatocytů opouští klidový stav buněčného cyklu G_0 , vstupuje do fáze G_1 a přejde přes G_1/S *checkpoint*. U potkana trvá tato fáze 12-18 hodin. Je nejkratší ze všech fází, ale je nejvíce studovanou ve snaze identifikovat primární podněty, které spouštějí regeneraci jater. Studie ukázaly rychlé a významné změny četných signálních drah a dalších tkáňových funkcí, žádná z dosud identifikovaných změn však není určující pro zdárný průběh regenerace (Michalopoulos 2010).

Proliferace (*progrese*) – hepatocyty syntetizují DNA, proběhne buněčné dělení a hepatocyty se vracejí do G_0 fáze, část hepatocytů vstupuje do dalšího mitotického cyklu. Dochází k remodelaci extracelulární matrix (ECM) a dochází k dělení dalších jaterních buněk – cholangiocyty a endoteliálních buněk jaterních sinusoid. Tato fáze trvá u potkana až 4 dny (Michalopoulos and DeFrances 2005).

Terminace – tato fáze trvající od 4 do 7 dne, popřípadě déle je charakterizována poklesem prorůstových podnětů a přítomností inhibičních signálů.

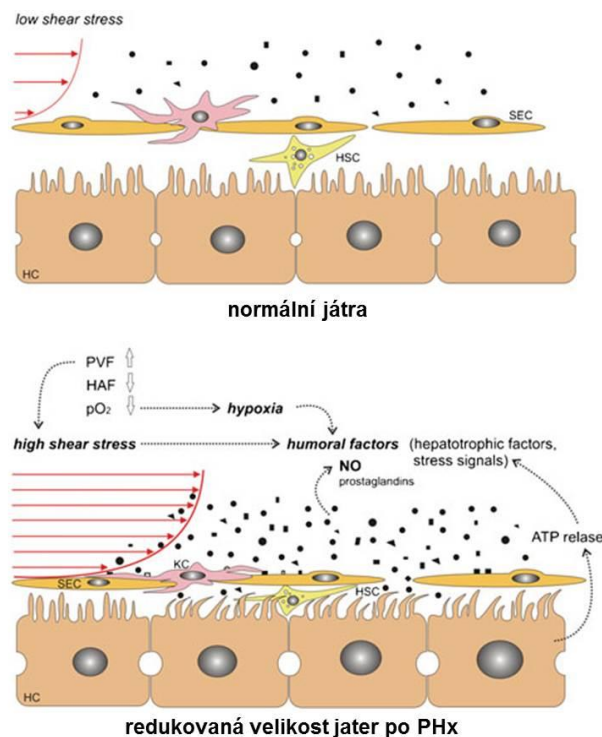


Obrázek č. 7 - Regenerace jater po 2/3 PHx

NO - oxid dusnatý, Tx – transkripce, ECM – extracelulární matrix
(Häussinger 2011)

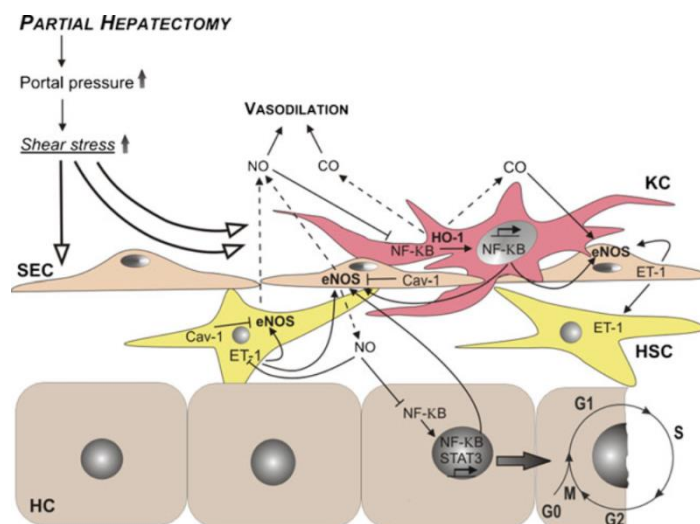
Iniciace

Úplně první změnou, ke které dochází po PHx je okamžitá změna hemodynamiky v játrech. Játra jsou zásobena krví ze dvou zdrojů, *v. portae* přivádí 75 % krve bohaté na živiny, ale také látky vstřebané ze střeva nebo produkované gastrointestinálním traktem, jako jsou bakterie, endotoxin a další toxiny, žlučové kyseliny a další látky. Zbýlých 25 % krve přichází cestou *a. hepatica*, tato krev přivádí do jater především kyslík, hormony, cytokiny a imunokompetentní buňky. Průtok krve cestou *v. portae* se po PHx zvyšuje na trojnásobek, zvyšuje se rovněž portální tlak a dochází k indukci smykového napětí (Schoen *et al.* 2001), v důsledku zvýšeného přítoku portální krve dochází k relativnímu přebytku látek ze střeva a pankreatu, např. inzulin, epidermální růstový faktor (EGF), endotoxin (lipopolysacharid, který je důležitou součástí vnější membrány gramnegativních bakterií), nutriční substráty a další. Naopak průtok krve jaterní arterií se mírně snižuje a dochází k mírné hypoxii (Abshagen *et al.* 2012), která spolu se smykovým napětím aktivuje faktory potřebné pro regeneraci jater (obr. č. 8).



Obrázek č. 8 - Role hemodynamických změn v indukci signální kaskády spouštějící regeneraci jater 2/3 PHx.
Podle (Abshagen *et al.* 2012)

Smykové napětí významně ovlivňuje rovnováhu mezi tvorbou vazokonstrikčních látek, např. endoteliny, a vazodilatačních působků, především oxidu dusnatého a oxidu uhelnatého. Tato rovnováha je hlavním mechanismem regulace mikrocirkulace v játrech (Schoen *et al.* 2001). V intaktních játrech je NO syntetizován především konstitutivní NO-syntázou v endoteliálních buňkách, po PHx dochází současně k aktivaci této konstitutivní NO-syntázy a zvýšení exprese indukibilní NO-syntázy především v Kupfferových buňkách (Hortelano *et al.* 2007). Kromě vasodilatačního účinku se NO podílí na aktivaci transkripčních faktorů, které se významně uplatňují při regulaci jaterní regenerace (obr. 9). V iniciační fázi regenerace jater dochází také ke změně mitochondriálního membránového potenciálu směrem k hyperpolarizaci (Nishihira *et al.* 1986) a zvýšené tvorbě ROS.

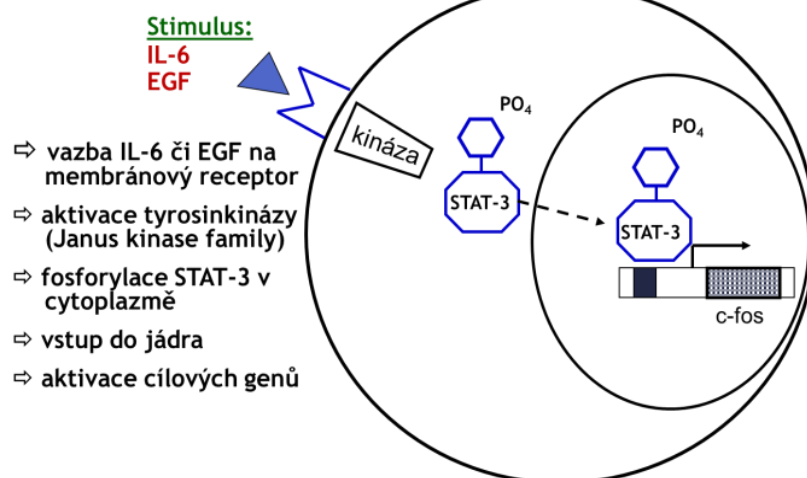


Obrázek č. 9 - Role Kupfferových buněk v místní regulaci průtoku krve a buněčné proliferace.
(Abshagen et al. 2012)

V časně G₁ fázi, v období několika prvních hodin po PHx, stoupá koncentrace cytokinů, především TNF- α a interleukinu-6 (IL-6). Hlavním zdrojem těchto prozánětlivých cytokinů jsou neparenchymové jaterní buňky, především Kupfferovy buňky, endotelové buňky jaterních sinusoid a hvězdicové buňky (Zimmermann 2004). V odpovědi na tyto změny dochází k aktivaci protoonkogenů c-fos, c-myc, c-jun a c-kit se vztahem k proliferaci buněk, proces se označuje jako *immediate-early gene response* (Taub 1996). Okamžité časné geny je rozmanitá skupina genů včetně protoonkogenů, které kódují proteiny regulující pozdní G₁ fázi. Jedná se o proteiny důležité pro buněčný metabolismus a homeostázu glukózy, patří mezi ně glukóza-6-fosfatáza, *insulin-like growth factor binding protein* nebo fosfoenolpyruvátcarboxykináza (Leu et al. 2003). Transkripční aktivace je realizována indukcí transkripčních faktorů především NF- κ B, STAT-3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) a *activator protein 1* (Michalopoulos 2010). Transkripční faktory jsou v buňce přítomny v neaktivní podobě, adekvátní stimulus vede k jejich okamžité aktivaci (Gao 2005). Schéma aktivace STAT-3 uvádí obr. č. 10, aktivace NF- κ B obr. č. 11.

Model aktivace STAT-3

typická cesta aktivace hepatocytů



Obrázek č. 10 - Schéma aktivace transkripčního faktoru STAT-3 - cesta typická pro hepatocyty

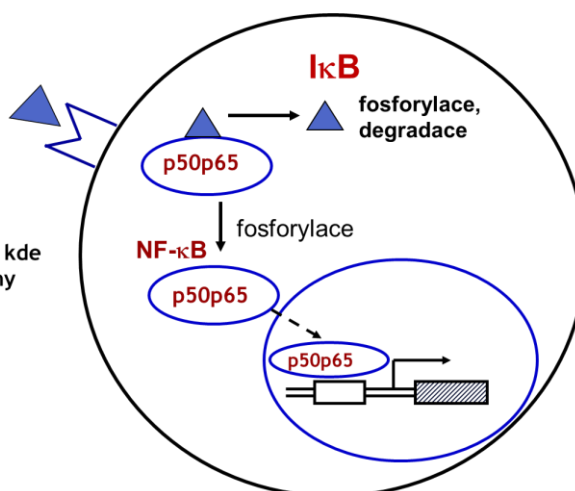
Model aktivace NF-κB

(typická cesta aktivace neparenchymových bb jater)

Stimulus:

TNF α
IL-1
LPS
UV záření
oxidační látky

NF-κB po aktivaci vstupuje do jádra, kde aktivuje cílové geny



Obrázek č. 11 - Schéma aktivace transkripčního faktoru NF-κB - cesta typická pro neparenchymové jaterní buňky

Proliferace

V této fázi regenerace jater po PHx dochází k expresi růstových faktorů, aktivaci protoonkogenů a dalších genů – H-ras, K-ras, p53 (*delayed-early gene response*) a aktivaci induktorů (c-fos, c-jun c-myc, p53) a inhibitorů (bcl-2) apoptózy. Mezi klíčové růstové faktory patří hepatocytární růstový faktor (HGF), dříve nazývaný *scatter factor*, EGF a transformující růstový faktor alfa (TGF- α) (Kren *et al.* 1997, Fausto *et al.* 2006). HGF je produkován neparenchymovými jaterními buňkami, především hvězdnicovými, hepatocyty ovlivňuje parakrinním způsobem. Prekursor HGF, pro-HGF, je po PHx rychle aktivován proteázami jako je urokinázový aktivátor plazminogenu (uPa) a jeho následný produkt plazmin (Currier *et al.* 2003). Blokáda uPa je provázena zpožděným uvolňováním HGF a opožděnou regenerací jater. HGF reguluje řadu procesů v játrech a je přímým stimulatorem proliferace hepatocytů. Vzhledem k tomu, že HGF a jeho receptor Met se uplatňuje jako významný růstový faktor v řadě dalších tkání, *knock-out* jejich genů vede k letálnímu fenotypu. Proto je obtížné využít genetické přístupy pro studium regulačních účinků HGF *in vivo* (Taub 2004). HGF, obdobně jako jiné růstové faktory, vykazuje pleiotropní účinek na různé mitogenní signální dráhy. Bylo prokázáno, že je velmi účinným mitogenem hepatocytů *in vitro*. Studie na izolovaných hepatocytech prokázaly, že účinek HGF je částečně zprostředkován *up-regulací* dalšího růstového faktoru, a to TGF- α . Protilátky proti TGF- α částečně inhibují DNA syntézu v regenerujících játrech (Tomiya *et al.* 2000). Dalším kompletním mitogenem hepatocytů je epidermální růstový faktor produkováný ve slinných žlázách a Brunnerových žlázách. EGF a TGF- α jsou do značné míry homologní a váží se na stejný receptor EGFR. U myši s homozygotní delecí genu pro TGF- α probíhá regenerace jater normálně pravděpodobně proto, že dochází k vzestupu koncentrace jiných ligandů vážících se na EGFR jako je *heparin binding EGF-like growth factor* nebo amfiregulin (Michalopoulos and Khan 2005). Dalším faktorem, který pravděpodobně ovlivňuje proliferaci, je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). Ten interaguje specificky s endoteliálními buňkami jaterních sinusoid a indukuje zvýšenou produkci HGF neparenchymovými buňkami. VEGF zprostředkovaná proliferace hepatocytů je závislá na přítomnosti endotelových buněk, přesný mechanismus jeho účinku není znám, nicméně alespoň částečně lze účinek VEGF blokovat protilátkami proti HGF (LeCouter *et al.* 2003).

Terminace

Studiu ukončení regenerace jater bylo věnováno mnohem méně pozornosti než její iniciaci a mnohem méně také rozumíme procesům, které tuto fázi řídí, ačkoli je nejméně stejně důležitá (Rychtrmoc *et al.* 2009). Regenerace jater po PHx je model kontrolovaného růstu tkáně, fascinující je skutečnost, že intenzivně proliferující tkáň, která intenzitou dělení připomíná růst maligně transformované tkáně, ukončí růst po obnovení populace buněk na výchozí hodnotu. Existují důkazy o tom, že počet hepatocytů na konci regeneračního procesu může přesáhnout původní hodnotu před PHx, v tomto období lze detegovat indukci apoptózy (Sakamoto *et al.* 1999). V řadě experimentů bylo prokázáno, že játra transplantovaná z většího zvířete (např. psa) do menšího se zmenšují a naopak. Tyto nálezy podporují teorii o existenci jakéhosi „hepatostatického“ kontrolního systému, který reguluje optimální velikost jater k zajištění jejich homeostatických funkcí (Michalopoulos 2007). V souvislosti s terminací regenerace jater byl nejčastěji studován transformující růstový faktor β (TGF- β), u kterého byla prokázána schopnost inhibovat proliferaci hepatocytů v podmínkách *in vitro* i *in vivo* (Jakowlew *et al.* 1991). TGF- β je produkován neparenchymovými buňkami, především hvězdicovými, byla však prokázána také exprese mRNA pro TGF- β a tvorba TGF- β proteinu v hepatocytech regenerujících jater (Bissell *et al.* 1995). Množství TGF- β receptorů se významně snižuje mezi 12 – 18 hodinou po PHx, v pozdních fázích se opět zvyšuje (Chari *et al.* 1995), byly popsány změny v expresi a citlivosti TGF- β receptorů také v podmínkách *in vitro* v primárních kulturách hepatocytů izolovaných z potkana po PHx (Nishikawa *et al.* 1998). Klíčovou úlohu TGF- β v účinné inhibici hepatocytární proliferace zpochybnila práce Oeho a spolupracovníků, kteří prokázali, že *knock-out* receptorových podjednotek TGF- β RII u myší po PHx nezabrání normálnímu ukončení regenerace (Oe *et al.* 2004). Na základě svých výsledků tito autoři konstatují, že neporušená signalizace zprostředkovaná TGF- β není bezpodmínečně nutná pro normální terminaci regenerace jater, jako alternativní kompenzační mechanismus v případě blokády TGF- β se může pravděpodobně uplatnit aktivin (Oe *et al.* 2004). Další významný kandidát řízení terminace regenerace jater byl popsán zcela recentně. Jedná se o protein fosfatázu 2A, která má mnohostrannou úlohu v regulaci buněčného cyklu. U myší s *knock-outem* pro katalytickou podjednotku této fosfatázy byla porušena terminace regenerace jater po PHx, játra u takto modifikovaných myší byla o 30 % větší ve srovnání se situací před operací (Lai *et al.* 2016).

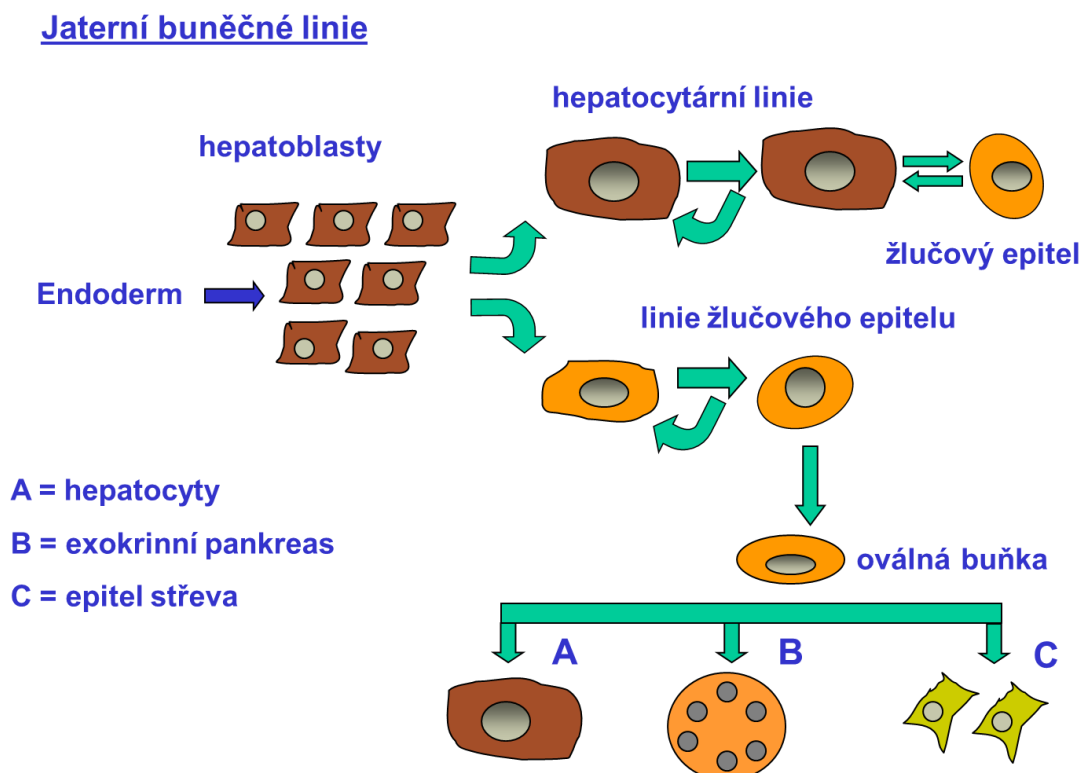
Úloha extracelulární matrix při regeneraci jater

Extracelulární matrix se spolu s růstovými faktory a cytokiny podílí na regeneraci jater. ECM obsahuje různé makromolekuly zahrnující fibronektin, kolagen, laminin, vitronektin a proteoglykany. Kromě toho, že ECM poskytuje podporu epiteliálním a endoteliálním buňkám, moduluje buněčnou diferenciaci, migraci, růst a apoptózu. Struktura ECM v játrech je odlišná od ostatních tkání, kde funguje jako difuzní bariéra mezi plazmou a bazální membránou. V játrech se ECM nachází v oblasti Disseho prostoru a v perisinusoidálním prostoru, rozdíl je v tom, že sinusoidy nemají pravou bazální membránu, což umožňuje maximální výměnu živin mezi krví a hepatocyty (Kim *et al.* 1997). Již výše bylo uvedeno, po PHx dochází k rychlé aktivaci uPa, který kromě aktivace HGF je hlavním induktorem kaskády metaloproteináz, jejichž aktivace vede k degradaci ECM. Roli metaloproteináz v procesu regenerace jater prokázali Alwayn a spolupracovníci, kteří ve své studii inhibovali metaloproteinázy širokospektrým inhibitorem – Marimastatem u myši po PHx a zjistili, že Marimastat vedl k signifikantní redukci mitotického indexu a *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) pozitivních buněk (Alwayn *et al.* 2008). Složení ECM se mění v průběhu regenerace po PHx, dochází k remodelaci a kolem 7. dne u potkana se složení ECM vrací ke stavu před operací.

Alternativní regenerace

Proliferace hepatocytů může být zablokována v případě, kdy poškození jaterní tkáně je příliš vážné, jako je tomu např. u akutního jaterního selhání u člověka. V experimentu lze proliferaci hepatocytů blokovat použitím 2-acetylaminofluorenu (AAP), látky, která při dlouhodobém používání vykazuje karcinogenní účinky. AAP blokuje proliferaci hepatocytů pravděpodobně tím, že vytváří AAP-DNA addukty, které zastavují proliferaci nejspíše prostřednictvím p53 a p21 (Ohlson *et al.* 1998). Pokud provedeme PHx pokusným zvířatům, kterým podáváme AAP, hepatocyty nemohou proliferovat. Za 1-3 dny po PHx epiteliální buňky malých žlučových a Herringových kanálků exprimují transkripční faktory a krátce na to dochází ke zvýšení počtu buněk se smíšenou expresí genů typických pro hepatocyty i cholangiocyty. Tyto buňky se s ohledem na tvar svých jader nazývají oválné buňky a mohou být alternativním zdrojem buněk pro regeneraci. Oválné buňky intenzivně proliferují v periportálních oblastech jaterního lobulu a jsou značně infiltrovány hvězdicovými buňkami, které vytvářejí spleť spolu s oválnými buňkami a produkují růstové faktory (HGF, fibrocytární růstový faktor, VEGF) (Evarts *et*

al. 1993). Za několik dní po aktivaci diferencují na zralé hepatocyty a obnoví původní populaci buněk (Fausto and Campbell 2003). Obrázek č. 12 uvádí jaterní buněčné linie a možnosti jejich diferenciaci.



Obrázek č. 12 - Jaterní buněčné linie – možnosti diferenciaci

2.1.4 Metody hodnocení intenzity regenerace

Míru regenerační odpovědi lze kvantifikovat různými metodami (Assy and Minuk 1997, Jia 2011, Wei *et al.* 2015). Patří mezi ně:

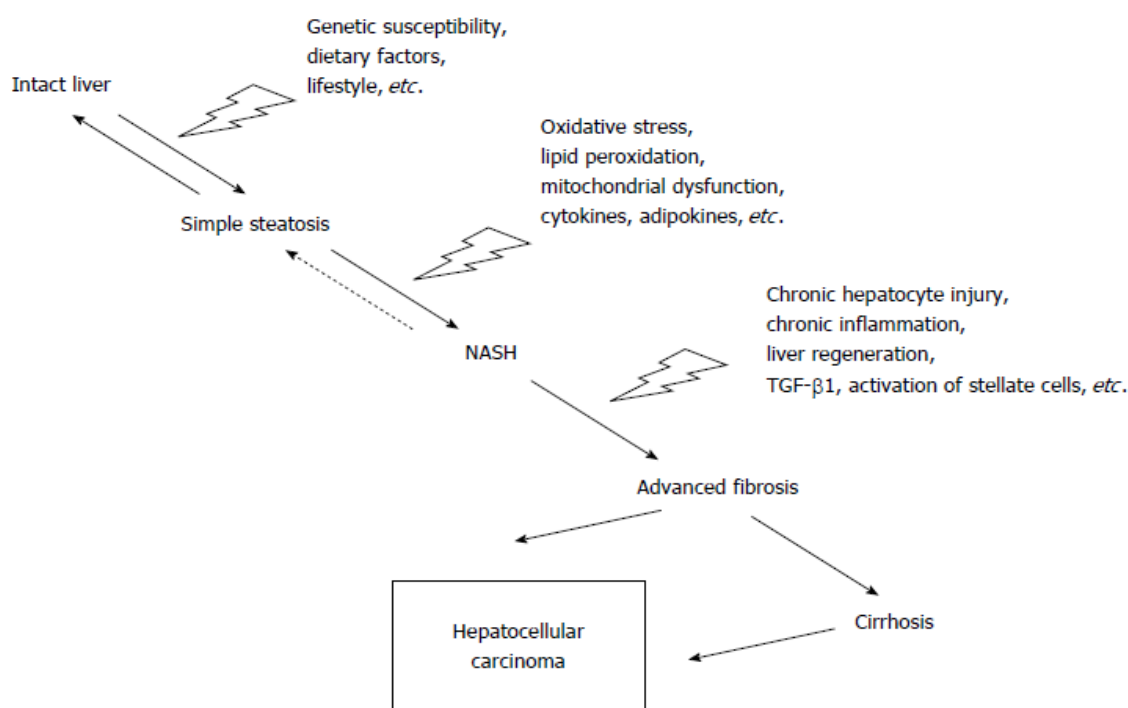
- hmotnost jater, relativní hmotnost jater je poměrně konstantní, málo se mění u zdravého jedince
- míru regenerace lze posuzovat podle nárůstu objemu jaterní tkáně. Rozvoj zobrazovacích technik umožňuje měření tohoto parametru v podmínkách *in vivo* pomocí počítačové tomografie nebo magnetické rezonance. V posledních letech byly vyvinuty zobrazovací přístroje umožňující sledování změn objemu a

vaskulární regenerace u malých laboratorních zvířat, dostupnost přístrojů pro tzv. mikrotomografii je malá s ohledem na jejich vysokou finanční náročnost (Wei *et al.* 2015)

- mitotický index hepatocytů odečítaný na hematoxilin-eosinem barvených histologických řezech jaterní tkáně
- určení syntézy DNA – lze použít několik metod – měření inkorporace značeného tymidinu (^3H -tymidin) do DNA, inkorporace bromdeoxyuridinu (BrdU) do DNA, popř. pomocí průtokové cytometrie. S výhodou se používají imunohistochemické metody umožňující vizualizaci proteinů asociovaných s buněčným cyklem. Patří mezi ně např. Ki-67 – jaderný protein, který je přísně asociovaný s buněčnou proliferací a je přítomen ve všech fázích buněčného dělení (Bullwinkel *et al.* 2006). Dalším důležitým markerem je PCNA nezbytný pro replikaci DNA u eukaryotických buněk, jeho exprese závisí na buněčném cyklu, lze jej detegovat na konci fáze G1, maximální hodnoty jsou přítomny v S fázi (Assy *et al.* 1998).

2.2 Nealkoholové ztukovatění jater

Nealkoholové ztukovatění jater (NAFLD, *non-alcoholic fatty liver disease*) je považováno za nejčastější chronické onemocnění jater ve vyspělých zemích Evropy a v USA (Vernon *et al.* 2011). Jde o metabolické onemocnění jater charakterizované přítomností jaterní steatózy vzniklé na podkladě inzulinorezistence u geneticky predisponovaných jedinců. Současně musí být vyloučeny jiné důvody jaterní steatózy (příjem alkoholu, léky, hladovění, parenterální výživa, virová hepatitida C, dědičná onemocnění jater aj.) (Chalasani *et al.* 2012). Při histologickém vyšetření nalézáme alespoň 5 % steatotických hepatocytů (Kleiner *et al.* 2005). NAFLD zahrnuje škálu patologických stavů od prosté malokapénkové, smíšené nebo velkokapénkové steatózy, přes nealkoholovou steatohepatitidu (*non-alcoholic steatohepatitis*, NASH) po jaterní cirhózu ev. hepatocelulární karcinom (obr. 13). Právě histologický typ NAFLD dále určuje prognózu pacienta.



Obrázek 13 – Schéma možné progresy NAFLD

(Kucera and Cervinkova 2014)

Podle recentní metaanalýzy je globální prevalence NAFLD 25,24 % s největší prevalencí na středním východě a v severní Americe a nejnižší v Africe (Younossi *et al.* 2016). V Evropě je pak prevalence na základě „*random effects model*“ odhadována na 23,71 %. Zajímavé jsou údaje i o prevalenci NASH u pacientů s NAFLD, které tato metanalytická studie uvádí. Zatímco u pacientů bez indikace k jaterní biopsii je prevalence NASH u pacientů s NAFLD v Asii 6,67 % a 29,85 % v severní Americe, u pacientů indikovaných k biopsii je prevalence 63,45 % pro Asii, 69,25 % pro Evropu a 60,64 % pro severní Ameriku (Younossi *et al.* 2016). Informace o NAFLD v České Republice jsou sporé, studie Dvořáka a spol. uvádí, že u českých diabetiků typu II byly ultrazvukově zjištěny v 79 % změny na játrech (u 66 % se jednalo o jaterní steatózu, u 9 % o fibrózu a u 4 % o cirhózu) (Dvorak *et al.* 2014). Právě NAFLD je s vysokou mírou pravděpodobnosti zodpovědné za vznik tzv. kryptogenní cirhózy (Farrell and Larter 2006). Incidence hepatocelulárního karcinomu mezi pacienty s NAFLD je 0,44 na 1000 pacientů a rok (Younossi *et al.* 2016). Zatímco u lidí s NAFLD je mortalita spojená s onemocněními jater 0,77 a celková mortalita 11,77 na 1000 pacientů a rok, u pacientů s NASH je mortalita spojená s jaterními onemocněními 15,44 a celková mortalita 25,56 na 100 pacientů a rok (Younossi *et al.* 2016).

Je velmi dobře známá asociace NAFLD s dalšími metabolickými onemocněními. Jedná se především o obezitu, diabetes mellitus typu II, dyslipidemii a hypertenzi, což jsou hlavní součásti metabolického syndromu. Prevalence metabolického syndromu u NAFLD se pak odhaduje na 42,54 % a u pacientů s NASH dokonce na 70,65 % (Younossi *et al.* 2016) a více než 90% pacientů s NAFLD má alespoň jeden znak metabolického syndromu (Marchesini *et al.* 2003). Metabolický syndrom, též syndrom inzulínové rezistence, je definován pomocí klinických a laboratorních nálezů jako přítomnost alespoň 3 z 5 diagnostických kritérií. Mezi tato kritéria patří (Alberti *et al.* 2009):

- 1) abdominální obezita definovaná pomocí obvodu pasu ≥ 94 (102) cm u mužů nebo ≥ 80 (88) cm
- 2) plazmatická koncentrace triacylglycerolů $\geq 1,7$ mmol/l, resp. léčba její zvýšené hladiny
- 3) plazmatická koncentrace HDL-cholesterolu $< 1,0$ mmol/l u mužů nebo $< 1,3$ mmol/l u žen, resp. léčba její snížené koncentrace
- 4) hypertenze – systolický krevní tlak ≥ 130 mm Hg nebo diastolický krevní tlak ≥ 85 mm Hg, resp. léčba hypertenze
- 5) glykémie na lačno $\geq 5,6$ mmol/l, přítomnost diabetu nebo léčba těchto stavů.

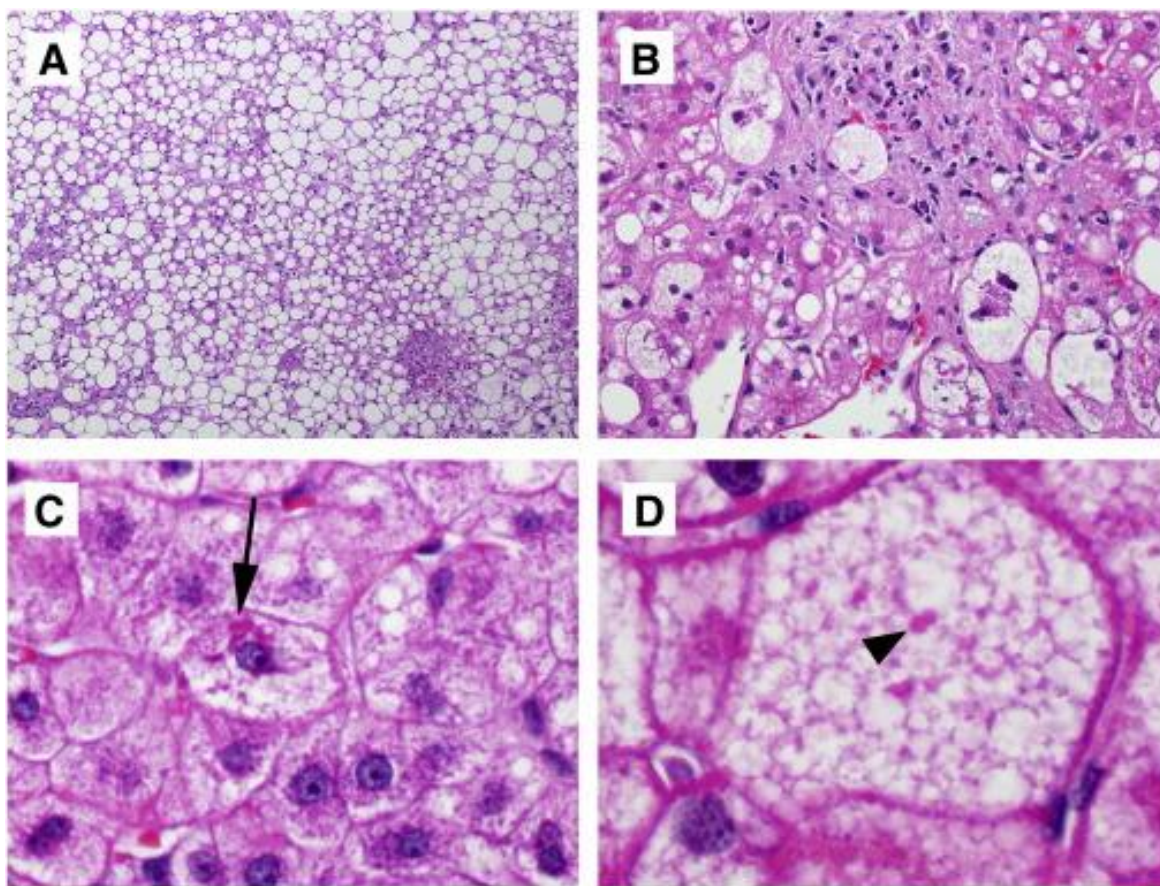
2.2.1 Histologické hodnocení nealkoholového ztukovatění jater

V současné době se používá několik histopatologických klasifikací. Přestože bylo navrženo několik systémů hodnocení NAFLD resp. NASH, není obecný konsensus v jejich používání. Některé histologické znaky NAFLD jsou ukázány na obr. 14.

V roce 1999 byla publikována práce Matteoniho a kol. (Matteoni *et al.* 1999), ve které je NAFLD děleno na 4 typy: 1) prostá steatóza (bez zánětu či fibrózy), 2) steatóza s přítomným lobulárním zánětem bez fibrózy či balónové degenerace hepatocytů, 3) steatóza s přítomným zánětem a fibrózou (NASH), 4) steatóza, zánět, balónová degenerace a Mylloryho hyalin či fibróza (NASH).

Ve stejném roce Bruntová a kol. (Brunt *et al.* 1999) navrhla *grading* a *staging* systém pro NASH. Grading NASH je založen na přítomnosti a stupni steatózy, balónové degenerace hepatocytů a intraacinárního a portálního zánětu. Stupeň 1 (*grade 1*) – steatóza do 66 % hepatocytů s možnou přítomností balónové degenerace v zóně 3 či intraacinární přítomnost lymfocytů (bez chronického zánětu v portálních oblastech); stupeň 2 (*grade 2*) – steatóza + balónová degenerace hepatocytů + pericelulární fibróza + mírný až střední portální chronický zánět; stupeň 3 (*grade 3*) – panacinární steatóza + balónová degenerace + přítomnost chronického zánětu. *Staging NASH* pak hodnotí lokalizaci a rozsah fibrózy: 1) perisinusoidální fibróza ve 3. zóně acinu, 2) portální fibróza, 3) *bridging* fibróza, 4) cirhóza.

Dalším systémem je semikvantitativně skórující systém tzv. *Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network* publikovaný v roce 2005 (Kleiner *et al.* 2005). Tento systém popisuje tzv. *Nonalcoholic fatty liver disease Activity Score* (NAS), které hodnotí stupeň steatózy (0-3), lobulárního zánětu (0-2), balónovou degeneraci (0-2) a fibrózu (0-4). $NAS \geq 5$ odpovídá diagnóze NASH a $NAS < 3$ znamená nepřítomnost NASH. Mimo tyto semikvantitativně hodnocené parametry se určuje ještě dalších 10 charakteristik (jejich přítomnost nebo nepřítomnost). Tento systém není určen pro diagnózu NASH, ale spíše pro výzkumné účely.



Obrázek č. 14 - Histologické znaky NASH (barvení hematoxylin-eosinem). A) Steatóza, 10×; B) balónová degenerace hepatocytů, 40×; C) Malloryho tělíska (šipka), 60×; D) Megamitochondrie (šipka) v hepatocytu s mikrovezikulární steatózou, 60×.
(Brown and Kleiner 2016)

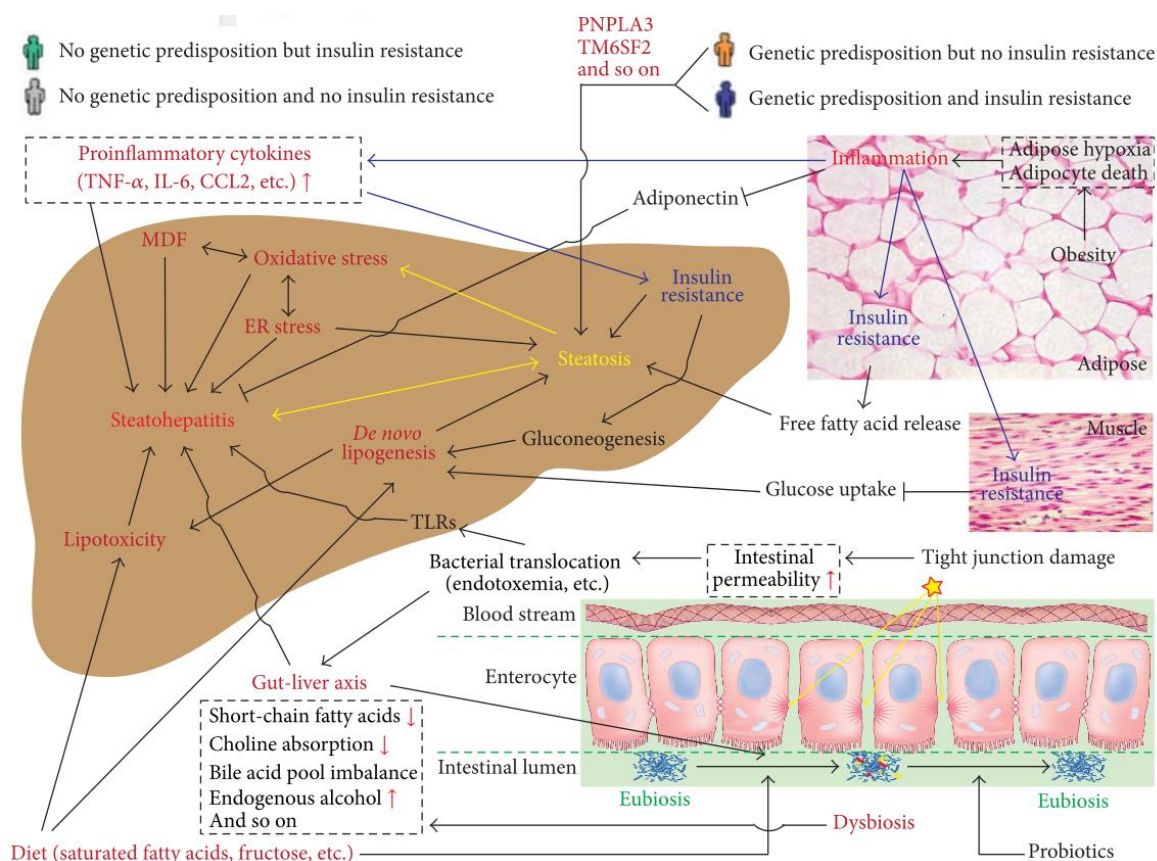
2.2.2 Etiopatogeneze nealkoholového ztukovatění jater

NAFLD je multifaktoriální metabolické onemocnění jater charakterizované přítomností jaterní steatózy. V etiopatogenezi NAFLD hrají roli vlivy prostředí (nadměrný energetický příjem, nevhodné složení potravy, sedavý způsob života s nedostatkem pohybu aj.), genetické faktory i vnitřní vlivy (inzulinová rezistence aj.). Složitost etiopatogeneze NAFLD je znázorněna na obr. 15. Některými autory je pak NAFLD označováno za jaterní manifestaci metabolického syndromu (Machado and Cortez-Pinto 2006). Právě inzulinorezistence zaujímá ústřední úlohu v komplexní etiopatogenezi NAFLD.

K hromadění tuků v játrech vede jednak zvýšený příjem triacylglycerolů (TAG) potravou, zvýšená nabídka volných mastných kyselin (FFAs) např. při lipolýze, zvýšená

lipogeneze v játrech, snížená utilizace tuků v játrech anebo snížený výdej TAG z jater. Tyto faktory vedou ke vzniku a rozvoji prosté jaterní steatózy (*non-alcoholic fatty liver*), která tvoří podklad pro možnou progresi do nealkoholové steatohepatitidy. V roce 1998 popsali Day a James teorii dvou zásahů, která popisuje vznik steatohepatitidy na podkladě jaterní steatózy (Day and James 1998). Hepatocyty senzitivované zvýšeným obsahem TAG jsou pak náchylnější k dalším inzultům, mezi které patří mitochondriální dysfunkce, zvýšený oxidační stres, lipotoxicita FFAs, aktivace nespecifické imunity v játrech či nerovnováha v produkci různých cytokinů (Day 2006).

Tyto inzulty pak mohou vést až ke smrti hepatocytů. Indukce a průběh buněčné smrti u NAFLD, a zejména u NASH, je změněná (Machado and Cortez-Pinto 2011). Díky mitochondriální dysfunkci u NAFLD může být snížena dostupnost ATP, což může vést za určitých stavů až k navození nekrotické smrti (Serviddio *et al.* 2008). Rovněž programovaný typ buněčné smrti – apoptóza je u NAFLD (NASH) častěji pozorována. Proapoptoticky působí zvýšená koncentrace TNF- α v játrech, lipotoxicita volných mastných kyselin, mitochondriální dysfunkce či stres endoplazmatického retikula (Akazawa and Nakao 2016). Volné mastné kyseliny, zejména pak nasycené či transnenasycené, a jiné metabolity metabolismu lipidů narušují redoxní rovnováhu a indukují lipoapoptózu v hepatocytech (Akazawa and Nakao 2016). U NAFLD jsou rovněž popisovány změny autofagie, zejména důležitý je pak vliv nasycených mastných kyselin na inhibici tohoto procesu (Mei *et al.* 2011).



Obrázek č. 15 - Znázornění složitosti etiopatogeneze NAFLD
(Yu *et al.* 2016)

2.2.3 Mitochondriální dysfunkce

Změny ve funkci mitochondrií jsou často popisovány v experimentálních modelech NAFLD i ve vzorcích od pacientů s NAFLD. Stupeň mitochondriální dysfunkce často odpovídá stádiu NAFLD (Hortelano *et al.* 2007). Je popisována alterace ultrastruktury mitochondrií (*swelling* mitochondrií a matrixové změny) (Sanyal *et al.* 2001), mutace mitochondriální DNA (Kawahara *et al.* 2007), nižší aktivita mitochondriálních enzymů (Perez-Carreras *et al.* 2003, García-Ruiz *et al.* 2006), zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku mitochondriemi (Gambino *et al.* 2011, Rolo *et al.* 2012) či nižší produkce ATP (Cortez-Pinto *et al.* 1999). Při mitochondriální dysfunkci dochází k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány s následným únikem mezimembránových proteinů do cytosolu, což může vést k aktivaci apoptotické kaskády, snížení účinnosti dýchacího řetězce, ztrátě mitochondriálního membránového potenciálu (MMP) a zvýšenému oxidačnímu stresu (Ricci *et al.* 2003).

2.2.4 Oxidační stres

Oxidační stres vzniká na podkladě nerovnováhy mezi tvorbou volných radikálů na jedné straně a jejich odstraňováním na straně druhé. Za volný radikál se označuje atom, neutrální molekula či iont, který obsahuje alespoň jeden orbital s nepárovým elektronem (Štípek 2000). Mimo volné radikály existují i další reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku, které, přestože mají všechny elektrony spárované, jsou vysoce reaktivní. Společně s volnými radikály se nazývají reaktivní formy kyslíku a „*reactive nitrogen species*“ (RNS, reaktivní formy dusíku). ROS a RNS velmi ochotně reagují s různými biologickými molekulami (lipidy, fosfolipidy, proteiny, nukleové kyseliny aj.), které tím poškozují.

Právě oxidační stres je považován za jeden z klíčových faktorů v etiopatogenezi a progresi NAFLD (Day 2006). Pokud reagují ROS/RNS s mononenasycenými či polynenasycenými mastnými kyselinami (PUFA), dochází k indukci lipoperoxidačního poškození. Lipoperoxidace může vést k navození mitochondriální dysfunkce, progresi oxidačního stresu, aktivaci nespecifické imunity v játrech a zvýšení produkce profibrotických mediátorů (Soltys *et al.* 2001, Vendemiale *et al.* 2001, Pessayre *et al.* 2002). Již při pouhém zvýšení akumulace TAG v hepatocytech bez přítomnosti zánětu či nekrózy dochází k nárůstu tvorby ROS (Gao *et al.* 2004). Mimo přímého toxického účinku zvýšený oxidační stres zhoršuje i inzulínovou rezistenci jater (Gao *et al.* 2010).

K hlavním místům tvorby ROS v hepatocytech se řadí mitochondrie, endoplazmatické retikulum a peroxisomy. Mitochondrie, zejména pak komplex I a III dýchacího řetězce, jsou co do kvantity nejvýznamnějším producentem ROS (Nohl *et al.* 2005). Za stavu mitochondriální dysfunkce indukované např. NAFLD dochází k ještě většímu zvýšení tvorby ROS. Dalším důležitým zdrojem ROS jsou mikrozomy (endoplazmatické retikulum), kde jde zejména o činnost cytochromu P450 a ω -oxidaci mastných kyselin. U NAFLD dochází zvyšování aktivit některých biotransformačních enzymů včetně Cyp2E1 (Orellana *et al.* 2006, Baumgardner *et al.* 2008).

Mimo hepatocyty může ke zvýšenému oxidačnímu stresu v játrech při NAFLD přispívat i aktivace nespecifické imunity. Kupfferovy buňky a vycestovalé neutrofily tvoří řadu prozánětlivých cytokinů (Tilg 2010) a rovněž samy tvoří reaktivní formy kyslíku.

Mimo zvýšené produkce ROS je u NAFLD často popisována snížená antioxidační obrana jater (Nishihira *et al.* 1986, Duan *et al.* 2010). Oxidační stres pak narušuje redoxní stav uvnitř hepatocytů, což dokazuje změna poměru redukovaného glutathionu ku celkovému glutathionu nebo k oxidovanému glutathionu (GSSG) (Hardwick *et al.* 2010).

GSH je hlavním neproteinovým thiolovým antioxidantem hepatocytů. Mimo jeho role v obraně proti oxidačnímu stresu se podílí na intracelulární signalizaci, na redoxním stavu a je kofaktorem některých důležitých reakcí (Yuan and Kaplowitz 2009).

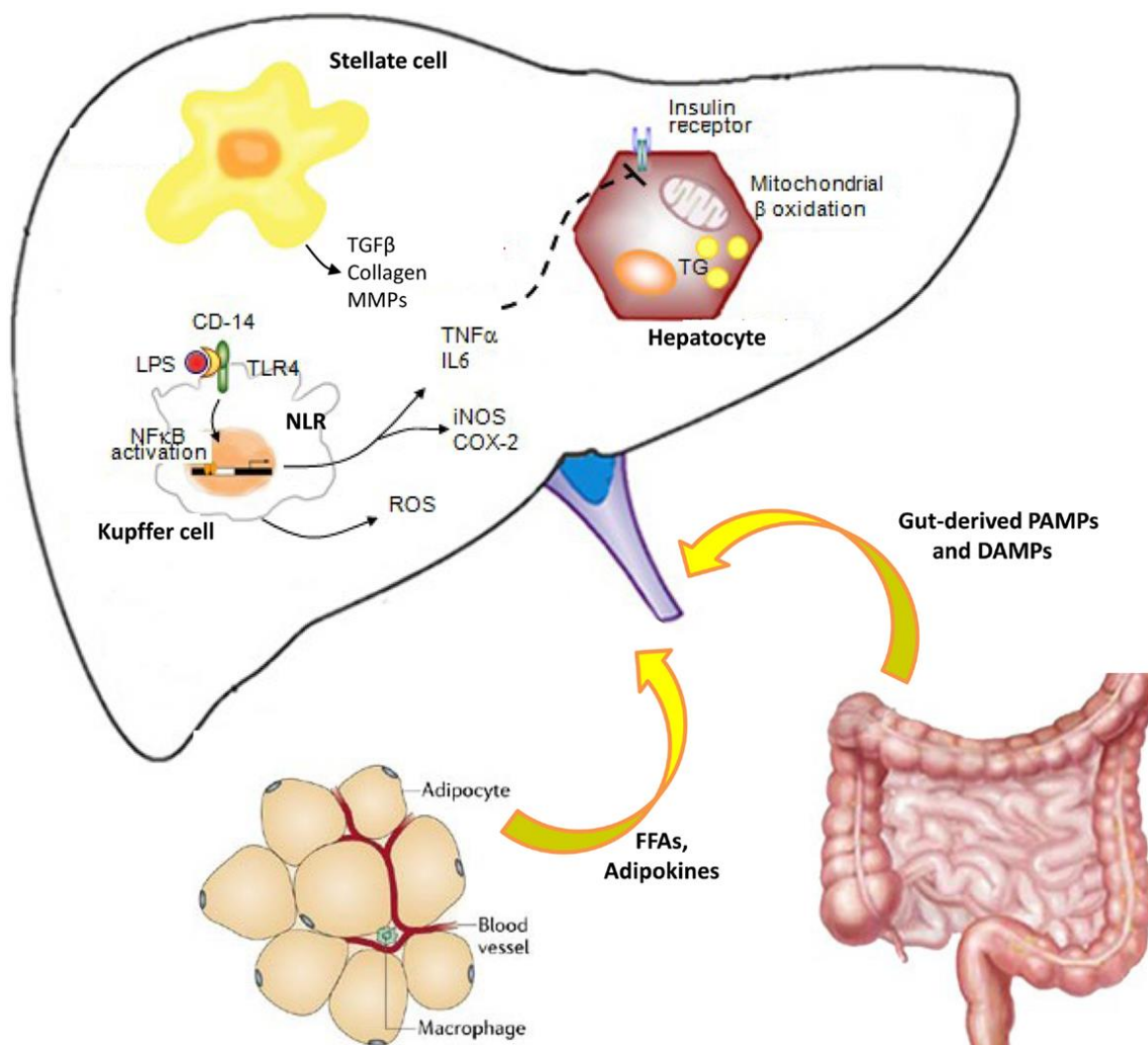
2.2.5 Změny v produkci cytokinů

U NAFLD je popisována zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů (např. tumor nekrotizující faktor α , interleukin-6, resistin aj.) a snížená tvorba protizánětlivě působících cytokinů (např. adiponektin) (Tilg 2010, Meli *et al.* 2014). Zdrojem prozánětlivě účinkujících cytokinů není jen samotná tukem změněná jaterní tkáň, ale i tuková tkáň zejména pak ve viscerální oblasti (Borst 2004). Ta pak přispívá k NAFLD nejen produkcí těchto cytokinů, ale i uvolňováním FFAs přímo do portální krve (obr. 16).

Tumor nekrotizující faktor α se řadí k proinflamačním cytokinům a v játrech je produkován zejména jaterními makrofágy. K jejich aktivaci přispívá střevní dysbióza a zvýšená propustnost střevní stěny vedoucí ke zvýšené nabídce lipopolysacharidu játrům u NAFLD (Leung *et al.* 2016). K dalším zdrojům TNF- α patří mírná aktivace nespecifické imunity při zvýšeném stupni apoptózy u NASH, poškození hepatocytů zvýšeným přísunem FFAs (Chavez-Tapia *et al.* 2013) či přímo tuková tkáň (Borst 2004). TNF- α přispívá k rozvoji jaterní steatózy (Endo *et al.* 2007), prohlubuje stav inzulinorezistence (Hirosumi *et al.* 2002), navozuje mitochondriální dysfunkci (Lu and Cederbaum 2010) a může se podílet na aktivaci zevní cesty apoptózy a rovněž i nekrózy. Samozřejmě jako prozánětlivý cytokin dále aktivuje nespecifické imunitní reakce.

Na rozdíl od TNF- α je adiponektin protizánětlivě působící cytokin. Jeho zdrojem je zejména tuková tkáň. Sérové koncentrace adiponektinu se snižují při NAFLD a zejména však u NASH (Targher *et al.* 2006). V hepatocytech více mechanismy brání rozvoji jaterní steatózy (Chaldakov *et al.* 2003), předchází vzniku inzulinové rezistence a jsou mu přisuzovány hepatoprotektivní vlastnosti. Hladiny adiponektinu klesají při zvyšující se koncentraci TNF- α a naopak adiponektin snižuje koncentraci TNF- α (Diehl 2005).

Mimo TNF- α a adiponektinu se na etiopatogenezi NAFLD podílí celá řada dalších cytokinů a adipokinů (leptin, resistin či další interleukiny).



Obrázek č. 16 - Role nespecifické imunity v etiopatogenezi NAFLD
(Meli *et al.* 2014).

2.2.6 Modely nealkoholového ztukovatění jater u potkanů

Pro pochopení komplexnosti etiopatogeneze NAFLD a možností její léčby bylo a je třeba vytvořit vhodné experimentální modely. Právě komplexnost vzniku a progresu NAFLD vyžaduje použití experimentálních zvířat a použití *in vitro* modelů vyhraňuje pro studium některých dílčích procesů. Ideální zvířecí model by měl odrážet všechny aspekty lidského NAFLD (etiopatogeneze, histologické nálezy apod.) (Kucera and Cervinkova 2014). Nejčastěji používaná zvířata k vytvoření modelu NAFLD jsou myši a potkani, ačkoli další savčí i nesavčí druhy jsou používány (ptáci, ryby). Velkým problémem stále zůstává translace poznatků ze zvířat (homogenní experimentální skupiny, definovaná dieta

a chovné podmínky apod.) na lidi (heterogenní populace, různé stravovací návyky a životní styl) (Kucera and Cervinkova 2014). V experimentu se využívají zejména nutriční modely, genetické modely, příp. kombinace obou těchto přístupů.

2.2.6.1 Nutriční modely nealkoholového ztukovatění jater

Pro indukci NAFLD u zvířat se obvykle využívá krmení steatogenními dietami. Těmito dietami může být strava s vyšším obsahem tuků, fruktózy, sacharózy, cholesterolu, případně jejich vzájemná kombinace nebo strava bez obsahu či se sníženým obsahem esenciálních látek (např. methionin, cholin-deficientní dieta) (Kucera and Cervinkova 2014). V současnosti nejčastěji využívané jsou vysokotukové ev. kombinované diety.

Diety se zvýšeným obsahem tuků pro potkany znamenají obsah tuků nad 10 % energie ve formě tuků (Reeves *et al.* 1993), obvykle tyto diety obsahují více než 30 % energie ve formě tuků. Existuje mnoho různých experimentálních přístupů využívajících diet se zvýšeným obsahem tuků pro navození NAFLD (Kucera and Cervinkova 2014). Liší se procentuálním obsahem tuků, typem tuků (nasycenost/nenasycenost mastných kyselin), dobou krmení, druhem, kmenem, stářím a pohlavím experimentálních zvířat a dalšími parametry. Není proto divu, že výsledky různých prací jsou velmi rozdílné. Zatímco při použití určitých experimentálních designů došlo k navození histologického stavu podobného NASH (Lieber *et al.* 2004), u jiných prací se indukovala pouze prostá steatóza (Stoppeler *et al.* 2013), nebo ke ztukovatění jater nedošlo vůbec (Romestaing *et al.* 2007).

Poměrně úspěšné modely, které vyvolávají u potkanů steatohepatitické změny v játrech (steatóza, nekróza, balónová degenerace a fibróza), jsou založeny na použití diet se zvýšeným obsahem cholesterolu nebo na kombinaci zvýšeného obsahu cholesterolu a triacylglycerolů (Xu *et al.* 2010). Rovněž diety s vysokým obsahem fruktózy navozují steatohepatitidu se změnami podobnými metabolickému syndromu u lidí (Kawasaki *et al.* 2009). V posledních několika letech jsou pak velmi moderní diety typu „fast food“, které mimo zvýšeného obsahu tuků a fruktózy často obsahují i zvýšené procento cholesterolu či transnenasycených mastných kyselin (Kucera and Cervinkova 2014). Tato strava je velmi úspěšná při indukci metabolických abnormalit (obezita, dyslipidemie, porušená glukózová tolerance, inzulinorezistence) s postižením jater (ztukovatění, zánět, fibróza).

Methionin, cholin-deficientní dieta

Methionin, cholin-deficientní dieta (MCDD) vede k blokádě sekrece lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL) z jater (Veteläinen *et al.* 2007), což má za následek hromadění tuků v játrech a postupný rozvoj zánětlivého poškození jater. Přestože histologický obraz nejprve ukazuje prostou steatózu a později stav podobný NASH s navozením oxidačního stresu (Yang *et al.* 2000, Veteläinen *et al.* 2007), u pokusného zvířete se rozvíjí kachektický stav bez inzulinové rezistence (Kucera and Cervinkova 2014). Existuje i cholin-deficientní dieta, která vede k indukci prosté steatózy bez významného zánětlivého a fibrotického poškození jater (Veteläinen *et al.* 2007).

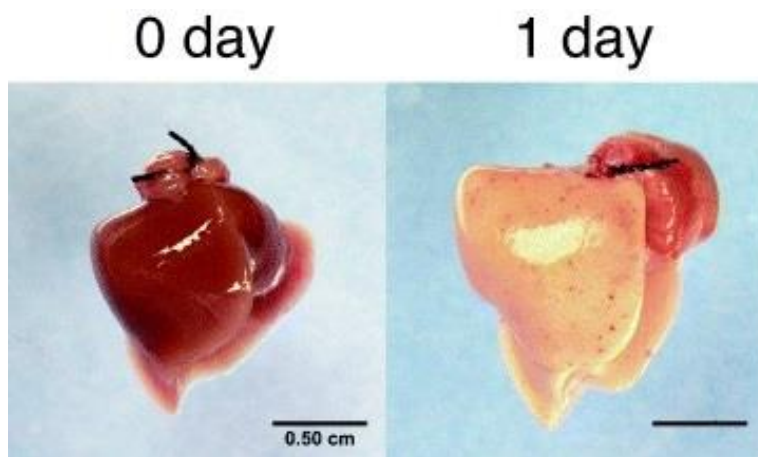
2.2.6.2 Genetické modely nealkoholového ztukovatění jater

Genetické modely jsou u potkanů využívány daleko méně, než je tomu u myší (Nagarajan *et al.* 2012). Mezi nejčastěji používané genetické modely patří obézní Zuckerovi potkani, u kterých se vyvinula přirozená mutace leptinového receptoru vedoucí k leptinové rezistenci. U těchto potkanů se postupně rozvíjí obezita a inzulinová rezistence. Stav připomíná metabolický syndrom, játra podléhají steatotickým změnám bez progresu do NASH (Kucera and Cervinkova 2014). Mimo obézních Zuckerových potkanů se používá ke studiu NAFLD jen málo dalších genetických modelů (např. transgenní spontánně hypertenzní potkani nebo tzv. *Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty* potkani).

2.2.7 Regenerace jater postižených nealkoholovým ztukovatěním

Steatóza je průvodním jevem prereplikativní fáze regenerace jater. U pokusných zvířat dochází k akumulaci tuků (obr. č. 17), především triacylglycerolů a esterů cholesterolu, ve zbytku jaterní tkáně po PHx, tento fenomén je znám desítky let (Murray *et al.* 1981). Co je důvodem této přechodné steatózy je stále předmětem studia, ale již v polovině 60. let minulého století jako první popsali Šimek a Sedláček pokles respiračního kvocientu v řízcích jaterní tkáně potkanů po částečné hepatektomii, což svědčí pro nutriční preferenci lipidů v regenerujících játrech (Simek and Sedlacek 1965, Simek and Sedlacek 1966). Po redukci jaterní tkáně PHx dochází k přechodné hypoglykemii následované uvolněním hormonů (glukokortikoidy a katecholaminy) s aktivačním účinkem na hormon-senzitivní lipázu tukové tkáně. To vede k mobilizaci tuků a zvýšenému přísunu mastných

kyselin do jater. Podání dextrózy vede k inhibici proliferace po PHx, (Rudnick and Davidson 2012), předpokládá se, že tento inhibiční účinek může být způsoben dextrózou indukovanou bloádou uvolnění mastných kyselin z tukových zásob. Skutečnost, že infuze inhibitoru β -oxidace MK tlumí regeneraci jater po PHx, je dalším nálezem svědčím pro preferenci získávání energie β -oxidací mastných kyselin (Nakatani *et al.* 1981).



Obrázek č. 17 Akumulace lipidů v játrech myši za 24 hodiny po PHx. (Hata *et al.* 2007)

S významně stoupající prevalencí tukového postižení jater v ekonomicky vyspělých zemích se dostala do popředí otázka, zda jsou játra postižená NAFLD schopná normální regenerační odpovědi. Tento zájem je kromě výzkumných důvodů motivován především klinickou potřebou. V současné době jsou rozsáhlé chirurgické zákroky na játrech běžnou praxí, ať už se jedná o parciální resekce jater pro ložisková postižení, nebo zákroky spojené s transplantací jater. Je třeba rozhodnout, zda steatóza, popř. jaká míra tukového postižení, je riziková z hlediska požadované regenerační odpovědi. Jak experimentální, tak i klinické výsledky dosavadních studií jsou rozporuplné.

Řada experimentálních prací dokladuje, že akumulace tuků v játrech inhibuje normální regenerační odpověď. Regeneraci jater po PHx u potkana s NAFLD indukovaném methionin, cholin-deficientní dietou studovala Vetelainenová a spolupracovníci. U potkanů s prostou steatózou sice nezaznamenali pokles proliferací aktivity hepatocytů, ale pozorovali zpomalení obnovy funkčních parametrů, především tvorby ATP (Vetelainen *et al.* 2007a). Pokud stejnou dietou indukovali steatózu provázenou zánětlivou reakcí, došlo k signifikantní inhibici regenerace provázené zvýšenou lipoperoxidací a Kupfferovými buňkami zprostředkovaným hepatocelulárním

poškozením (Vetelainen *et al.* 2007b). Ve shodě s názorem o negativním účinku akumulace tuků v játrech na regeneraci je i práce, která sledovala průběh regenerace jater u leptin deficientních myší s rozsáhlou steatózou a která ukázala, že u těchto myší dochází k narušení regenerační odpovědi po PHx a podávání leptinu nevedlo ke zlepšení regenerace (Leclercq *et al.* 2006). Na rozdíl od předchozích studií DeAngelis a spolupracovníci použili model steatózy indukovaný výhradně vysokotukovou dietou, tedy model, který se více blíží situaci u člověka (DeAngelis *et al.* 2005). Pozorovali u myší živených vysokotukovou dietou snížení regenerační odpovědi po PHx a prokázali, že tento účinek byl provázen zvýšenou expresí inhibitoru nukleárního faktoru NF- κ B, který inhibuje aktivaci NF- κ B a následnou indukci jeho cílových genů, cyklinu D1 a Bcl-xL. Zcela protichůdné výsledky zaznamenali Zhang a spolupracovníci, kteří použili model indukce NAFLD čtyřtýdenním podáváním methionin, cholin-deficientní diety potkanům a po té provedli PHx. Parametry regenerace jater sledovali v intervalu 24 hodin po částečné hepatektomii a nepozorovali žádný rozdíl od kontrolních potkanů, míru závažnosti steatózy ve své práci nedokumentovali (Zhang *et al.* 1999). K obdobným výsledkům dospěl i Picard se spolupracovníky, kteří sledovali regeneraci jater za 24 hodiny po PHx u potkanů se steatózu navozenou 3 způsoby: podáváním methionin cholin deficientní diety, přidáním 5 % kyseliny orotové do standardní laboratorní diety a použitím obézních Zuckerových potkanů. Pouze u poslední skupiny došlo k signifikantnímu poklesu DNA v játrech, tento účinek autoři přičítají jiným faktorům, než je samotná steatóza, uvažují především o dysfunkci receptoru pro leptin, která byla u Zuckerových potkanů prokázána. U ostatních dvou modelů nebyla v této studii časná fáze regenerace jater ovlivněna (Zhang *et al.* 1999).

Nejednotné jsou i zkušenosti z klinické praxe. Studie sledující 54 živých donorů jaterního štěpu s mírnou nebo střední steatózou byla provedena v letech 2002 – 2003 v Národní univerzitní nemocnici v Soulu. Po dobu jednoho roku od poskytnutí jaterního štěpu byli dárce pravidelně vyšetřováni, kromě parametrů jaterního poškození a funkční kapacity, byla sledována regenerační odpověď (Cho *et al.* 2006). Žádný z donorů nezemřel a u žádného z nich nedošlo k akutnímu jaternímu selhání. Volumetrická analýza neprokázala významný rozdíl v regeneraci jater u donorů se steatotickými játry ve srovnání s kontrolami (Cho *et al.* 2006). V jiné práci však bylo zjištěno, že mírná a závažná steatóza je provázena vyšší perioperační morbiditou (Behrns *et al.* 1998). Tito autoři považují steatózu jater za varovný faktor, který je vždy třeba pečlivě zvážit u pacienta před jaterní resekci.

Užitečná data poskytuje přehledová práce popisující meta-analýzu šesti studií zahrnujících více než 1000 pacientů se steatózou jako rizikovým faktorem rozsáhlé resekce jater u člověka (de Meijer et al. 2010). Závěrem tohoto přehledového článku autoři konstatují, že pacienti se steatózou mají více než dvojnásobné riziko pooperačních komplikací, a ti, kteří trpí závažnou steatózou, mají dokonce trojnásobně vyšší riziko smrti.

3. CÍLE PRÁCE

- 1) Vzhledem k tomu, že na pracovišti ústavu fyziologie nebyl k dispozici model NAFLD, mým prvním úkolem bylo tento model zavést.
- 2) Zjistit, zda regenerace jater po parciální hepatektomii je u potkanů s NAFLD alterována.
- 3) Zjistit, zda steatotické hepatocyty izolované ze ztukovatělých jater vykazují změněnou citlivost vůči oxidačnímu stresu v podmínkách *in vitro*.

4. METODIKY

4.1 Metodiky pokusů *in vivo*

4.1.1 Pokusná zvířata

K pokusům *in vivo* byli použiti samci potkanů kmene Wistar (BioTest, ČR) a Spargue-Dawley (AnLab, ČR). Pokusná zvířata byla ustájena v klecích ve skupinách za standardních podmínek (teplota $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, vzdušná vlhkost $55\pm 10\%$, výměna vzduchu 10x/h, 12h střídání světla a tmy). Zvířata měla volný přístup ke kohoutkové vodě a k pokusným dietám (viz níže). Potkani byli použiti jednak pro zavedení modelu nealkoholového ztukovatění jater v podmínkách *in vivo* a následně pro sledování vlivu jaterní steatózy na regeneraci jater po 2/3 PHx. O všechna zvířata bylo postaráno podle platné legislativy ČR. Všechny pokusy byly předem schváleny „Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání“ při Lékařské fakultě v Hradci Králové (nově „Odborná komise pro dobré životní podmínky zvířat“) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (č. j. 8555/2007-30 a č. j. 18324/2008-30).

4.1.2 Zavedení modelu nealkoholového ztukovatění jater na potkanech

V první fázi jsme pro zavedení modelu NAFLD na potkanech rozdělili celkem 73 potkanů do 12 skupin (viz tab. 1, 250 ± 30 g), které jsme krmili standardní dietou (ST-1, Velaz, ČR) dietou se středním (MFD) a vysokým obsahem tuku (HFD) pro dobu 3 resp. 6 týdnů. Přesnější složení diet je uvedeno v tabulce 2. Dieta MFD a HFD byla vytvořena na našem pracovišti podle modelu publikovaného prof. Lieberem (Lieber *et al.* 2004). Vitamínové a minerální zajištění diet bylo hrazeno komerčně dodávanými doplňky (*MP Biomedicals*, Solon, USA). Během pokusu jsme sledovali průměrný přírůstek váhy, spotřebu vody a diet 3x týdně. Před zakončením pokusu potkani hladověli po dobu 14 hodin. Z usmrcených zvířat byly odebrány vzorky jater a séra. Vzorky, které se ihned nepoužily pro další stanovení, byly zamrazeny v tekutém dusíku a při -84°C skladovány v hlubokomrazícím boxu.

Kmen	Doba krmení	Skupina	Počet zvířat ve skupině
Wistar	3 týdny	ST-1	5
Wistar	3 týdny	MFD	5
Wistar	3 týdny	HFD	5
Sprague-Dawley	3 týdny	ST-1	6
Sprague-Dawley	3 týdny	MFD	6
Sprague-Dawley	3 týdny	HFD	6
Wistar	6 týdnů	ST-1	6
Wistar	6 týdnů	MFD	7
Wistar	6 týdnů	HFD	7
Sprague-Dawley	6 týdnů	ST-1	6
Sprague-Dawley	6 týdnů	MFD	7 (6)*
Sprague-Dawley	6 týdnů	HFD	7

Tabulka 1 – Rozdělení skupin potkanů pro zavedení modelu NAFLD *in vivo*. (* 1 potkan v průběhu pokusu uhynul, bez souvislosti s pokusem)

	% energie ve formě tuků	% energie ve formě proteinů	% energie ve formě sacharidů
ST-1	10	30	60
MFD	35	18	47
HFD	71	18	11

Tabulka 2 – Podíl jednotlivých živin na energetickém obsahu jednotlivých diet.

4.1.3 Studium regenerace steatotických jater po 2/3 parciální hepatektomii na potkanech

Na základě výsledků získaných při zavádění modelu NAFLD na potkanech jsme pro studium regenerace jater po 2/3 PHx zvolili kmen Sprague-Dawley (AnLab, ČR) a krmení ST-1 (DOS 2B, Velaz, ČR) a HFD po dobu 6 týdnů. Podmínky chovu jsou totožné jako při zavádění modelu NAFLD (4.1.2). Celkem 72 potkanů bylo rozděleno do 14 skupin (viz tab. 3, 240 ± 20 g). Během pokusu jsme sledovali průměrný přírůstek váhy, spotřebu vody a diet 3x týdně. Před zakončením pokusu potkani hladověli po dobu 14 hodin. U části potkanů byla po 6 týdnech provedena 2/3 parciální hepatektomie (odnětí 65 – 70 % jaterní tkáně, tzn. levý laterální a mediální lalok) (Higgins and Anderson 1931), resp. horní střední laparotomie (LAP) a 24, 48 a 72 hodiny po operaci byli potkani usmrceni. Z usmrcených zvířat byly odebrány vzorky jater a séra, rovněž vzorky jater po 2/3 PHx byly zváženy a

použity k dalšímu zpracování. Vzorky, které se ihned nepoužily pro další stanovení, byly zamrazeny v tekutém dusíku a při -84 °C skladovány v hlubokomrazícím boxu.

Skupina	Počet zvířat ve skupině	Dieta
ST-1	6	ST-1
ST-1_PHx_24h	6	ST-1
ST-1_PHx_48h	6	ST-1
ST-1_PHx_72h	6	ST-1
HFD	6	HFD
HFD_PHx_24h	6	HFD
HFD_PHx_48h	6	HFD
HFD_PHx_72h	6	HFD
ST-1_LAP_24h	4	ST-1
ST-1_LAP_48h	4	ST-1
ST-1_LAP_72h	4	ST-1
HFD_LAP_24h	4	HFD
HFD_LAP_48h	4	HFD
HFD_LAP_72h	4	HFD

Tabulka 3 – Rozdělení skupin potkanů pro studium regenerace jater na modelu NAFLD u potkanů.

4.1.4 Biochemická vyšetření séra

Z bifurkace aorty byla odebrána srážlivá krev, která po vytvoření koagula byla centrifugována a vzniklé sérum bylo odebráno k biochemickým analýzám. Zamražené sérum bylo odesláno na Ústav klinické biochemie a diagnostiky ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, kde na biochemických analyzátoch za použití komerčních kitů (biochemické kity firmy Roche Diagnostics, měřeno na Cobas Integra 800, Roche Diagnostics) byly změřeny sérové koncentrace glukózy, celkového bilirubinu a TAG a aktivity alaninaminotransferázy (ALT), aspartátaminotransferázy (AST) a alkalické fosfatázy (ALP).

4.1.5 Stanovení sérové cytokinů

V séru potkanů jsme rovněž podle instrukcí výrobce stanovili pomocí ELISA kitů (BMS625, BMS623, Bender MedSystems, Rakousko) koncentrace IL-6 a TGFβ1.

4.1.6 Stanovení respirace izolovaných mitochondrií a jaterního homogenátu

Mitochondrie byly izolovány z homogenátů jater potkana (teflonový homogenizér, 0°C) pomocí konvenční diferenční centrifugace (Bustamante *et al.* 1977, Svatkova *et al.* 1996). Spotřeba kyslíku izolovanými mitochondriemi resp. jaterním homogenátem byla měřena pomocí vysokoúčinné respirometrie (Oxygraph 2K, Oroboros Instruments, Rakousko). Měření byla prováděna v 2ml komůrkách v draselném médiu (100 mM KCl, 10 mM Tris HCl, 4 mM fosforečnan draselný, 3 mM chlorid hořečnatý, 1 mM EDTA, výsledné pH bylo upraveno na 7,4) při 30 °C (Drahota *et al.* 2005). Byla měřena konzumpce kyslíku mitochondriemi resp. homogenátem ve stavu 4 (pouze substráty jednotlivých komplexů) a ve stavu 3 (1 mM ADP a substráty jednotlivých komplexů) v přítomnosti substrátů respiračního komplexu I (5 mM glutamát, 3 mM malát) a II (10 mM sukcinát). Z poměru respirace ve stavu 3 a stavu 4 jsme vypočítali index respirační kontroly (RCI). Pro vyhodnocení naměřených křivek byl použit počítačový program DatLab 3.1 a 4.0 (OROBOROS software, Rakousko).

4.1.7 Stanovení obsahu redukováného a oxidovaného glutathionu v jaterním homogenátu

Pro stanovení obsahu redukováného a oxidovaného glutathionu v jaterním homogenátu jsme použili modifikovanou fluorimetrickou metodu (Hissin and Hilf 1976, Roušar *et al.* 2012).

Nejprve byla játra (2 - 3 g) v chladném manitolovém médiu (220 mM manitol, 70 mM sacharóza, 2 mM Hepes, 1 mM EGTA, 0,1% sérový bovinní albumin, pH upraveno na 7.2) homogenizována (4 °C, homogenizace na ledu, teflonový homogenizér, ředění 1:9). K 0,4 ml homogenátu přidáme 0,8 ml chladné 10% kyseliny metafosforečné (4 °C, ředění 1:2) a protřepeme. Následuje centrifugace při 20 000 g při 4 °C. Pro stanovení GSH a GSSG odebereme po 100 µl supernatantu, které zamrazíme (-84 °C).

K zamraženému vzorku supernatantu přidáme 1 ml fosfátového pufru (100 mM, 1 mM EDTA, pH 8,0). Po důkladném promíchání bylo 60 µl tohoto roztoku přepipetováno do 900 µl fosfátového pufru a přidáno 60 µl o-ftalaldehydu (0,1%, rozpuštěný v metanolu). Vzorky byly inkubovány 15 minut ve tmě při pokojové teplotě a acidifikovány na pH 6

(1M HCl). Poté byla měřena fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$) na luminiscenčním spektrofluorimetru Aminco Bowman Series 2 (Thermo Spectronic).

4.1.8 Stanovení obsahu jaterní DNA

Obsah DNA v játrech byl stanoven pomocí difenylaminové metody popsané Burtonem (Burton 1968).

4.1.9 Stanovení koncentrace proteinů

Proteiny v homogenátech a izolovaných mitochondriích byly stanovovány pomocí metody popsané Bradfordem (Bradford 1976). Pro vytvoření kalibrační křivky byl použit sérový bovinní albumin (Sigma-Aldrich) jako standard.

4.1.10 Stanovení obsahu tkáňového malondialdehydu a koncentrace tkáňových cytokinů

Ihned po odběru vzorků byly 0,6 g kousky jater zamraženy v tekutém dusíku a skladovány až do analýzy při -84°C . Tyto vzorky byly zhomogenizovány v RIPA pufru (Sigma-Aldrich) a zcentrifugovány (10 000 g, 4°C , 10 min.). Koncentrace jaterního IL-6 a TGF- β 1 byly stanoveny v supernatantu metodou ELISA (BenderMed System, Rakousko) podle instrukcí výrobce.

Celkový obsah malondialdehydu (MDA) v jaterní tkáni byl stanoven pomocí mírně modifikované HPLC metody (Pilz *et al.* 2000, Popelova *et al.* 2008). Po alkalické hydrolýze zreagoval MDA s 2,4-dinitrofenylhydrazinem a produkt byl stanoven na HPLC s obrácenou fází (Agilent, USA).

4.1.11 Stanovení exprese mRNA uncoupling proteinu 2

Ze zamražených vzorků jater byla nejprve extrahována celková RNA pomocí kitu (RNA Blue, Top-Bio, ČR). Pro kvantifikaci exprese mRNA pro *uncoupling protein 2* (UCP-2) byla použita RT-PCR. Při prvním kroku proběhla reverzní transkripce a amplifikace s jednovláknovou cDNA a celkovou RNA [oligo(dT) primer (Generi-Biotech, ČR) a M-MLV reverzní transkriptázou (Top-Bio), ABI Prism 7900HT technology, TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, USA)]. Specifické primery a

hdyrolyzační sondy pro UCP-2 byly navrženy firmou Generi-Biotech (přímý *primer* 5'AAGACCATTCACGAGAGGA3', reverzní *primer* 5'GCAAGGGAGGTCGTCTGTC3', sonda 5'CCCAATGTTGCCCCGAAATGCC3' značená FAM BHQ). Pro normalizaci dat byla použita exprese mRNA genu pro surfeit 1 (Generi-Biotech).

4.1.12 Jaterní histologie

Vzorky jater byly ihned po vyjmutí ze zvířete fixovány ve 4% neutrálním formalínu. Pro barvení hematoxylin-eosinem a imunohistochemickou detekci inkorporovaného bromdeoxyuridinu byly připraveny parafinové řezy (6 µm). Pro vizualizaci jaterní steatózy byly připraveny z fixovaných jater zmražené řezy, které byly obarveny pomocí Sudanu 3 nebo olejové červeně. Parafinové řezy obarvené hematoxylin-eosinem sloužily pro stanovení stupně jaterní steatózy (stupeň 1 – 0 – 25 % steatotických hepatocytů, stupeň 2 – 26 – 50 % steatotických hepatocytů, stupeň 3 – 51 – 75 % steatotických hepatocytů, stupeň 4 – 76 – 100 % steatotických hepatocytů), přítomnosti zánětu a případné nekrózy (průměr z 10 polí pro každý preparát). Třístupňová stupnice navržená Avnim a kolektivem (Avni *et al.* 2004) byla použita pro semikvantifikaci zánětu a nekrózy (0 = normální nález; 1 = mírný; 2 = střední; 3 = závažný).

Potkanům, u kterých jsme sledovali regenerační odpověď jater, jsme 1 hodinu před usmrcením intraperitoneálně aplikovali bromdeoxyuridin v dávce 100 mg/kg váhy těla (rozpuštěný v *aqua pro injectione*). Na připravených parafinových řezech jaterní tkáň se imunohistochemicky označila BrdU-pozitivní jádra hepatocytů, ve kterých probíhá DNA syntéza. Hydrolýza DNA byla provedena pomocí 2N HCl po dobu 30 min. při 4 °C, poté následovala přes noc při 4 °C inkubace vzorků s myší monoklonální anti-BrdU protilátkou (DAKO, ČR, ředění 1:100). Po promytí následovala inkubace s biotinylovanými sekundárními protilátkami proti myším protilátkám (Jackson ImmunoResearch, USA; ředění 1:500) po dobu 45 min. při pokojové teplotě. Poté se přidal streptavidinový konjugát s peroxidázou (DAKO, ČR; ředění 1:300) na 45 min. Zobrazení protilátkou značeného BrdU bylo provedeno pomocí 3,3'-diaminobenzidintetrahydrochloridu (Sigma-Aldrich) a peroxidu vodíku. Dále bylo provedeno dobarvení pomocí 0,1% metylové zeleně.

Počet BrdU-pozitivních jader byl určen nejméně v 10 mikroskopických polích v každém preparátu při zvětšení objektivu 10x pomocí mikroskopu Olympus IX51

(Olympus, ČR). Kvantifikace byla provedena za pomoci PC programu NIS-Elements AR2.30 (Nikon, Japonsko).

4.1.13 Stanovení obsahu triacylglycerolů a cholesterolu v játrech

Nejprve byla extrahována ze zamražených vzorků jater (0,5 g) lipidová složka pomocí chloroform-metanolové extrakce (Bligh and Dyer 1959). Ta byla následně rozpuštěna v izopropanolu a obsah triacylglycerolů a cholesterolu byl stanoven komerčně dostupnými kity (Roche Diagnostics, Německo).

4.2 Metodiky pokusů *in vitro*

4.2.1 Pokusná zvířata

K pokusům *in vitro* byli použiti samci potkanů kmene Wistar (BioTest, ČR). Podmínky ustájení a krmení dietami ST-1 a HFD byly shodné jako v pokusech *in vivo* (viz 4.1.1.). Hepatocyty izolované z intaktních a steatotických jater byly použity pro porovnání vlivu oxidačního stresu indukovaného terciárním butylhydroperoxidem (tBHP) na ztukovatělé a nesteatotické hepatocyty v podmínkách *in vitro*.

4.2.2 Izolace hepatocytů potkana

K izolaci hepatocytů potkana byla použita dvoustupňová perfúze jater (Berry 1991). Potkana v celkové anestézii připevníme na operační stůl, odesinfikujeme kůži na břiše, otevřeme dutinu břišní, do dolní duté žíly aplikujeme k zabránění aktivace koagulace heparin (Zentiva, 200 m.j. v 200 μ l) a zakanylujeme *vena portae*. Následuje perfúze jater roztokem bez obsahu Ca^{2+} (roztok A, 250 ml, 37 °C, perfúzní tlak dán vodním sloupcem cca 40 cm, tab. 4). Tento krok je důležitý pro rozrušení desmozomálních spojů mezi jaterními buňkami. Poté pokračujeme recirkulační perfúzí roztokem kolagenázy (0,16 g kolagenázy v 200 ml B roztoku, Collagenase NB4, SERVA Electrophoresis, Německo, tab. 4) za přítomnosti Ca^{2+} (37°C, 14 min). Kolagenáza natráví extracelulární hmotu, což v dalším kroku umožní rozrušení jaterní tkáně s uvolněním buněk do suspenze (roztok C, tab. 4). Buňky jsou následně přefiltrovány přes sterilní gázu do centrifugační zkumavky a zcentrifugovány (28 g, 4 °C, 5 min.). Odsajeme supernatant, přidáme čisté C médium a

opět zcentrifugujeme (28 g, 4 °C, 5 min.), tento krok ještě jednou opakujeme. Poté pokračujeme určením viability izolovaných buněk.

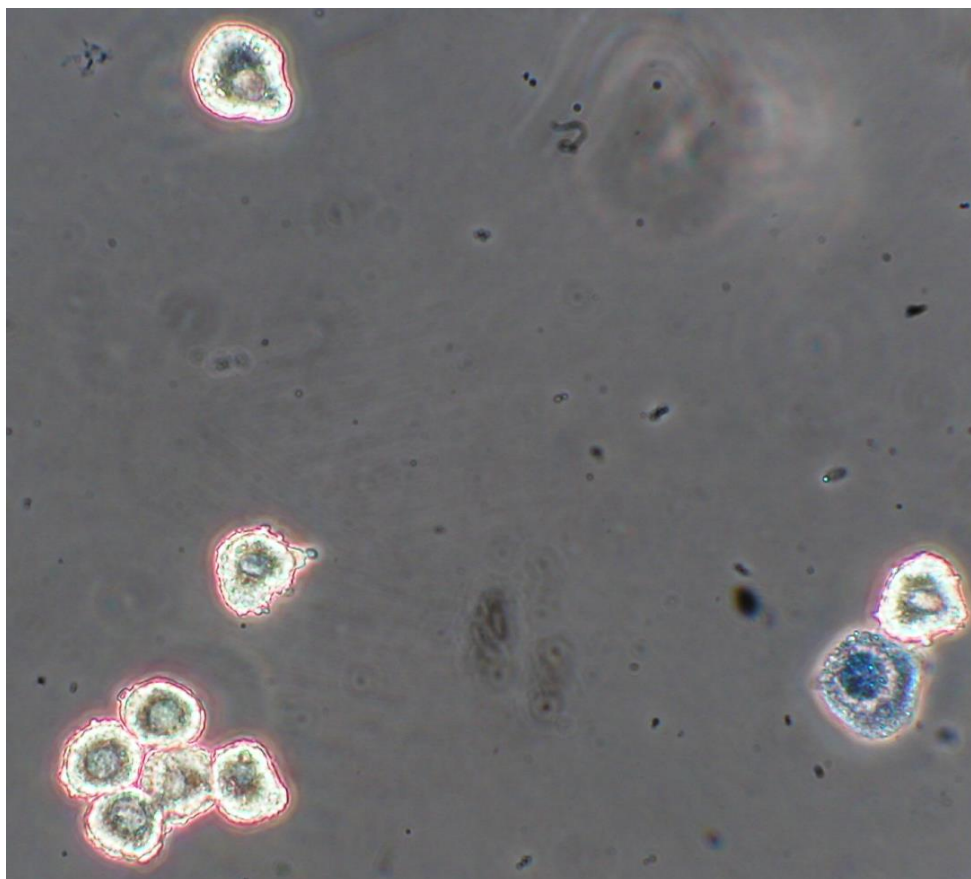
Roztok A	8 g NaCl; 0,4 g KCl; 0,0977 g $\text{MgSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$; 0,1206 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,06 g KH_2PO_4 ; 2,188 g NaHCO_3 ; 0,19 g EGTA, do 1000 ml doplněno destilovanou vodou, pH upraveno na 7,3 – 7,4.
Roztok B	4,8 g NaCl; 0,24 g KCl; 0,05862 g $\text{MgSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$; 0,07236 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,036 g KH_2PO_4 ; 0,3528 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,314 g NaHCO_3 ; doplněno do 600 ml destilovanou vodou, pH upraveno na 7,3 – 7,4
Roztok C	6,9 g NaCl; 0,36 g KCl; 0,1441 g $\text{MgSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$; 0,13 g KH_2PO_4 ; 0,374 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2g NaHCO_3 ; 0,9 g glukózy, doplněný do 1000 ml destilovanou vodou pro infúze. Poté přidáme 1,333 g albuminu do 100 ml C roztoku pro práci s izolovanými buňkami.

Tabulka 4 - Složení roztoků pro izolaci hepatocytů

4.2.3 Stanovení viability izolovaných hepatocytů

Viabilitu izolovaných buněk stanovujeme pomocí trypanové modři (sodné soli toluidin-diazo-diamino-naftol-disulfonové kyseliny, Tryptan blue, Sigma-Aldrich), která se v buňkách s intaktní plazmatickou membránou neakumuluje, naopak při poruše integrity této membrány dochází k hromadění trypanové modři v buňkách (barví se modře).

Vlastní provedení: Suspenzi hepatocytů naředíme 1:99 v C roztoku (10 μl buněk a 990 μl C roztoku). Naředěnou suspenzi smícháme s na podložním sklíčku s 10 μl 0,4% trypanové modři, přikryje krycím sklíčkem a při 100-200x zvětšení počítáme v 10 polích počet obarvených (mrtvých) a neobarvených (živých) buněk (obr. 18). Výslednou viabilitu uvádíme v procentech a spočítáme ji jako poměr živých buněk vůči celkovému počtu hodnocených buněk (živých + mrtvých).



Obrázek 18 - Stanovení viability izolovaných hepatocytů trypanovou modří (světelná mikroskopie, zvětšení objektivu 20x, modře obarvená buňka je mrtvá).

4.2.4 Určení denzity buněk

K určení denzity buněk v suspenzi izolovaných hepatocytů používáme automatizovaný systém Cellometer Auto T4 (Nexcelom Bioscience, USA), do kterého se vkládá plastový čip podobný Bürkerově komůrce. Do tohoto čipu se napipetuje suspenze naředěných hepatocytů (100x, viz 4.2.3) a přístroj automaticky po zadání ředění spočítá hustotu buněk v suspenzi. Pro vyloučení chyb je počet buněk v naředěné suspenzi stanovován 4x a jako výsledek bereme průměr těchto měření.

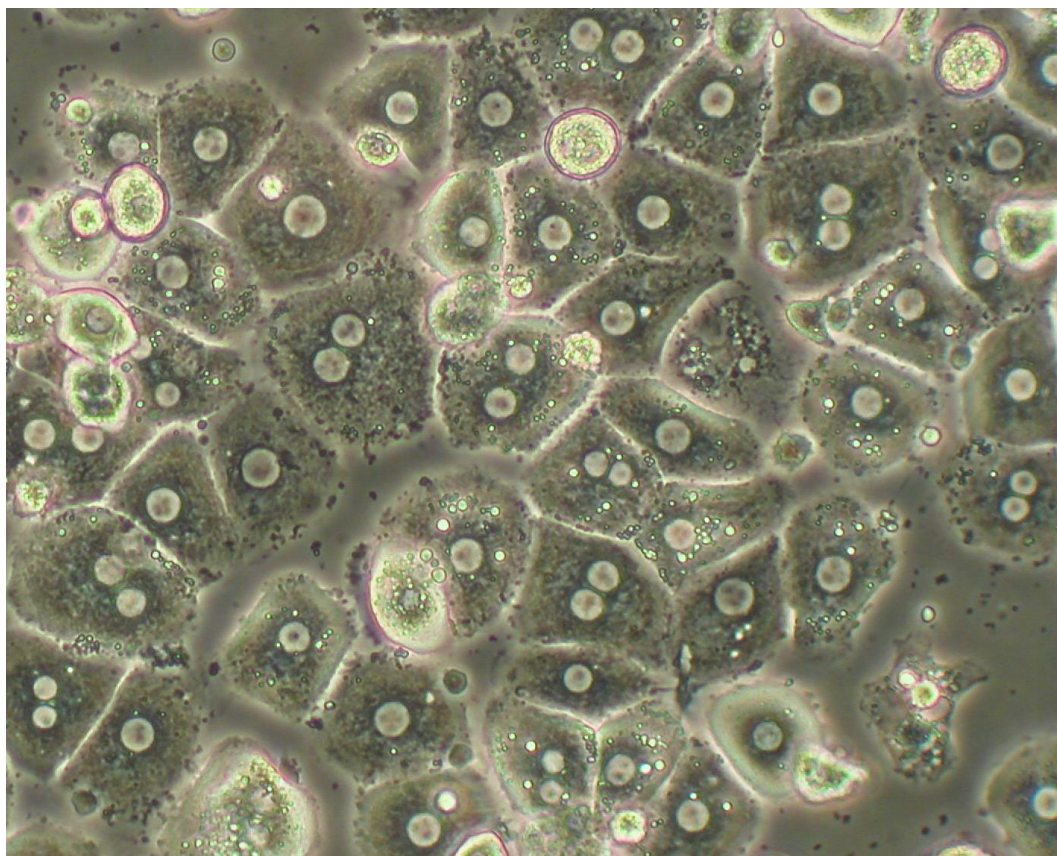
4.2.5 Příprava primárních kultur hepatocytů potkana

Pro pokusy v podmínkách *in vitro* používáme primární kultury hepatocytů potkana kultivované na polystyrenových 6-, 12-, 24- a 96-jamkových mikrotitračních destičkách (NUNC, tab. 5), které jsou potažené kolagenem typu I (Collagen Type I from Rat Tail,

Sigma-Aldrich). Před nasazením buněk jsou hepatocyty naředěny na denzitu 1 milion buněk na 1 ml (6-,12- a 24-jamkové destičky), resp. 330 tis. buněk na 1 ml (96-jamkové destičky) ve Williamsově E médiu (Williams E medium, bez L-glutaminu a fenolčerveně, Biotech). Pro přichycení buněk ke kolagenu (cca 2 – 3 hodiny) používáme Williamsovo E médium s 6% fetálním bovinním sérem (Biotech), L-glutaminem (2mM, Biotech), penicilinem (200 IU/ml, Biotech), streptomycinem (0,2 mg/ml, Biotech), inzulinem (0,08 IU/ml, Actrapid HM inj., Novo Nordisk), dexametazonem (0,5 µg/ml, Solu-Decotin, Merck) a glukagonem (8 ng/ml, Glukagen 1 mg inj HYPOKIT, Novo Nordik). Buňky jsou inkubovány v CO₂ inkubátoru (5% CO₂, 37 °C, 100% vlhkost). Po přichycení buněk (obr. 19) ke kolagenu odstraníme staré médium s nepřichycenými buňkami a vyměníme ho za médium nové (opět se suplementací, ale bez fetálního bovinního séra) s testovanou látkou. V našem pokusném uspořádání jsme porovnávali vliv induktoru oxidačního stresu terciárního butylhydroperoxidu (Sigma-Aldrich) v koncentraci 0,01 – 1 mmol/l na nesteatotické a ztukovatělé hepatocyty. Navíc jsme testovali vliv preinkubace a koinkubace hepatocytů s inhibitorem MPTP trifluorperazinem (TFP, Sigma-Aldrich, 5 µM) na poškození hepatocytů tBHP. Po uplynutí expozice testovaným látkám odebereme médium na biochemická stanovení a buňky se využijí pro další měření. Veškeré manipulace, jak s roztoky, tak i s buňkami, jsou prováděny v laminárním boxu za sterilních podmínek.

Destička	Počet buněk v 1 jamce	Objem média v 1 jamce
96-jamková	33 tis.	100 µl
24-jamková	200 tis.	200 µl
12-jamková	400 tis.	400 µl
6-jamková	1 mil.	1 ml

Tabulka 5 – Počet buněk a objem média v používaných kultivačních destičkách



Obrázek 19 - Vzhled hepatocytů za 2 hodiny po nasazení na kolagenované mikrotitrační destičky (fázový kontrast, zvětšení objektivu 20x).

4.2.6 Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy

Aktivita laktátdehydrogenázy (LDH) v kultivačním médiu je odrazem integrity buněčné membrány, neboť LDH je lokalizována cytozolu buněk a do média se uvolňuje proporcionálně k počtu buněk a k míře poškození plazmatické membrány. Kultivační médium (10 μ l) je smícháno s 250 μ l LDH činidla (DiaSys, Holzheim, Německo) a sledujeme úbytek absorbance při 340 nm při 37°C v čase (TECAN Infinite M200), který odpovídá rychlosti přeměny NADH na NAD⁺. Aktivita vzorku je vztažena k aktivitě standardu (TruCal U, DiaSys, Německo, aktivita LDH u kalibrátoru byla 419 IU/l).

4.2.7 Aktivita buněčných dehydrogenáz

Tento test stanovuje aktivitu buněčných dehydrogenáz, které ve viabilních buňkách redukují tetrazoliovou sůl (WST-1) na formazán. Do 96-jamkové destičky dáme 100 μ l

Williamsova E média s WST-1 v poměru 10:1, (*Cell Proliferation Reagent WST-1*, Roche Diagnostics, Německo). Změříme absorbanci v čase 0, 60 a 120 min. při 450 nm. Aktivitu buněčných dehydrogenáz zjistíme rozdílem absorbancí v čase 120 min a v čase 0 min. a porovnááme ji vůči kontrolám (100 %). V případě vysoké aktivity buněčných dehydrogenáz použijeme rozdíl absorbance v čase 60 min. a 0 min.

4.2.8 Stanovení intracelulárního obsahu redukovaného a oxidovaného glutathionu

Příprava vzorků: Z destičky (12-jamková kultivační destička) stáhneme kultivační médium a buňky lyzujeme přidáním destilované vody (400 μ l) a seškrabeme z plastu. Tuto suspenzi přepipetujeme do zkumavek a protřepeme. 200 μ l suspenze smícháme se 400 μ l chladné (4 °C) 10% kyseliny metafosforečné (Sigma-Aldrich), protřepeme a necháme inkubovat při 4 °C po dobu 10 min., opět protřepeme a centrifugujeme (20000 g, 4 °C, 10 min.). Supernatant pak použijeme pro stanovení obsahu intracelulárního GSH resp. GSSG (50 resp. 200 μ l supernatantu, skladováno při -80 °C).

Vlastní stanovení GSH a GSSG je shodné s kapitolou 4.1.7.

4.2.9 Stanovení produkce reaktivních kyslíkových derivátů

Produkci reaktivních kyslíkových derivátů lze v *in vitro* podmínkách stanovovat s využitím vhodných fluorescenčních sond, které se po kontaktu s ROS mění ve fluoreskující produkt. Jednou z těchto sond je i 5-(-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetát (CM-H₂DCFDA; Molecular Probes, USA).

Buňky jsou po expozici toxické látky propláchnuty a následně 45 min. inkubovány s 1 μ M CM-H₂DCFDA (rozpuštěno ve Williamsově E médiu). Poté jsou buňky propláchnuty a je přidáno čisté Williamsovo E médium. Následně se změří intenzita fluorescence v čase 0 a 40 min. (TECAN Infinite M200, Rakousko). Excitační vlnová délka je 485 nm a emisní vlnová délka 535 nm. Tvorba ROS odpovídá rozdílu fluorescence v čase 40 min. a 0 min. a vyjadřujeme ji v % (kontrolní buňky odpovídají 100 %).

4.2.10 Stanovení koncentrace malondialdehydu

Podobně jako v podmínkách *in vivo* stanovujeme sekundární produkt lipoperoxidace malondialdehyd v *in vitro* pokusech. Nicméně zde koncentraci MDA v kultivačním médiu stanovujeme jednoduchou chemickou reakcí s 2-thiobarbiturovou kyselinou. Tato metoda je založena na spektrofotometrickém měření kondenzačního produktu MDA se dvěma molekulami kyseliny thiobarbiturové (95 °C) (Ohkawa *et al.* 1979). Přestože jde o levnou a metodu, její specifická je nízká, neboť celá řada sloučenin reaguje s kyselinou thioabarbiturovou – souhrnně jde o tzv. *thiobarbituric acid reactive substances*.

Vlastní stanovení: 0,5 ml média smícháme s 0,5 ml 0,37% kyseliny thiobarbiturové (spolu s 15% trichloroctovou kyselinou a 0,25% HCl) a 15 min. inkubujeme při 95 °C, poté ochladíme, zcentrifugujeme (10 min., 1000g) a v supernatantu měříme absorbanci při 535 nm (TECAN Infinite M200).

4.2.11 Stanovení produkce albuminu

Produkce albuminu hepatocyty je jedním ze specifických funkčních markerů jaterní funkce, neboť je albumin výhradně tvořen v hepatocytech. K jeho měření využíváme vysoce specifickou a citlivou nekompetitivní sendvičovou ELISA metodu (*Rat Albumin ELISA Quantitation Set*, kat. č. E110-125, Bethyl, USA).

Metodu provádíme dle instrukcí v návodu k ELISA kitu. Nejprve do 96-jamkové destičky (C 96 Maxisorp, *NUNC – Immuno Plate*) přidáme 100 µl naředěných protilátek (1:100), které se naváží na stěnu destičky (20 – 25 °C, 1 h), 5x propláchneme, přidáme 200 µl blokovacího roztoku (20 – 25 °C, 30 min.), 5x propláchneme, přidáme 100 µl naředěného vzorku (20 – 25 °C, 1 h), 5x propláchneme, přidáme 100 µl naředěné křenové peroxidázy (1 : 30000, 1h), 5x propláchneme, přidáme 100 µl substrátu (temno, 15 – 25 min., 20 – 25 °C), nakonec zastavíme reakci přidáním 100 µl 2 M H₂SO₄. Měříme absorbanci při 450 nm (TECAN Infinite M200).

Pozn.: Před vlastním stanovením je třeba nejprve naředit vzorek média na koncentraci, která bude v rozmezí citlivosti metody (kalibrační křivky – 1,95 – 125,00 ng albuminu/ml).

4.2.12 Zobrazení mitochondriálního membránového potenciálu

Mitochondriální membránový potenciál lze v živých buňkách vizualizovat pomocí některých fluorescenčních sond. Na našem pracovišti používáme sondu JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylkarbokyaninjodid, *Molecular Probes*, USA). Tato kationová fluorescenční sonda se v závislosti na MMP akumuluje v mitochondriích. V mitochondriích s normálním (vysokým) MMP vytváří tzv. J-agregáty, které po osvětlení emitují červené/oranžové světlo (590 nm). Při nízkém MMP (deenergizované mitochondrie) nedochází k hromadění JC-1 v mitochondriích a tak je emitováno světlo zelené (530 nm).

Vlastní postup: Hepatocyty inkubujeme s 10 μM roztokem JC-1 (rozpuštěný ve Williamsově E médiu) v CO_2 inkubátoru (5% CO_2 , 37°C) po dobu 30min. Poté jsou buňky 2x propláchnuty čerstvým médiem a pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX51 (Olympus, Japonsko) vybaveného digitálním fotoaparátem (Olympus E600, Olympus, Japonsko) získáme fluorescenční mikrofotografie (zvětšení objektivu 40x). Buňky obsahující mitochondrie s vysokým MMP pak dáme do poměru ke všem sledovaným buňkám a výsledek vyjadřujeme v procentech.

4.2.13 Stanovení respirace izolovaných hepatocytů v suspenzi

Konzumpci kyslíku v nesteatotických a ztukovatělých hepatocytech (125 tis./ml) jsme měřili po 5minutové expozici buněk 0,25 mM tBHP v K^+ médiu (Cervinkova *et al.* 2007) při 30 °C po permeabilizaci plazmatické membrány digitoninem (10 $\mu\text{g/ml}$, Sigma Aldrich) pomocí vysokoúčinné respirometrie (Oxygraph 2K, Oroboros Instruments, Rakousko). Nejprve jsme stanovili respiraci ve stavu 4 (10mM glutamát + 2.5mM malát) a stavu 3 (10mM glutamát + 2.5mM malát + 1,5 mM ADP) pro substráty komplexu I. Poté jsme přidali sukcinát (10 mM, substrát komplexu II) a sledovali maximální ADP-stimulovanou respiraci za přítomnosti substrátů komplexů I a II. Rovněž jsme vypočítali RCI. Pro vyhodnocení naměřených křivek byl použit počítačový program DatLab 4.0 (OROBOROS software, Rakousko).

4.3 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Všechny statistické testy byly provedeny pomocí statistického softwaru *Graph-Pad Prism 4.03* (Graph Pad Software, USA). Před výběrem vlastních statistických analýz jsme testovali normalitu rozložení dat pomocí Kolmogorov-Smirnova testu normality. V případě, že data měla Gaussovské rozložení, jsme použili parametrickou 1-faktorovou ANOVA následovanou Tukey-Kramerovým post testem. V případě nenormální distribuce dat jsme použili neparametrický Kruskal-Wallisův test následovaný Dunnovým post testem. Hladina významnosti byla stanovena pro $p < 0,05$. K vytvoření grafů byly použity Graph-Pad Prism 4.03 a MS Excel (Microsoft).

5. VÝSLEDKY

5.1 Výsledky pokusů *in vivo*

5.1.1 Zavedení modelu nealkoholového ztukovatění jater potkana *in vivo*

5.1.1.1 Váhové charakteristiky a příjem diet

Výsledky jsou souhrnně uvedeny v tabulce 6. Počáteční váhy potkanů v žádné z pokusných skupin se navzájem nelišily. Rovněž konečné váhy v době ukončení experimentu se nelišily s výjimkou MFD u kmene Sprague-Dawley po 6 týdnech vs. ST-1 skupina u potkanů kmene Wistar po 6 týdnech ($p<0,05$). Přestože rozdíly v nárůstu hmotnosti nebyly signifikantní mezi kmeny Wistar a Sprague-Dawley, pozorovali jsme nesignifikantní trendy vyššího váhového přírůstku u potkanů kmene Wistar. Potkani kmene Wistar krmené ST-1 dietou pak přijímali průměrně větší množství energie než potkani kmene Sprague-Dawley krmené stejnou dietou. U potkanů kmene Sprague-Dawley jsme zjistili vyšší příjem energie u potkanů krmených MFD ($p<0,001$) a HFD ($p<0,001$) oproti ST-1 dietě po 3 týdnech a u potkanů krmených HFD oproti ST-1 dietě po 6 týdnech ($p<0,001$).

	Wistar - 3 týdny			Sprague-Dawley - 3 týdny			Wistar - 6 týdnů			Sprague-Dawley - 6 týdnů		
	ST-1	MFD	HFD	ST-1	MFD	HFD	ST-1	MFD	HFD	ST-1	MFD	HFD
Počáteční váha [g]	242±3	251±3	240±5	261±15	262±14	260±14	231±10	229±8	222±7	264±13	263±13	271±14
Konečná váha [g]	360±25	370±18	356±16	346±36	336±24	373±38	468±27	407±55	455±37	438±61	366±31*	464±43
Váhový přírůstek [g]	118±22	119±17	116±15	84±23	74±19	113±27	237±21	178±47	234±24	174±53	99±28**	192±34
Příjem energie [kJ/d]	423±63	405±85	406±122	348±19###	411±54***	416±45***	417±62	418±67	417±73	367±38+++	390±56	407±43***

Tabulka 6 – Váhové charakteristiky potkanů a průměrný denní příjem energie. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ± SD. (n=5-7; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ vs. ST-1 v odpovídající skupině; ### $p<0,001$ vs. potkani Wistar - 3 týdny krmení ST-1; +++ $p<0,001$ vs. potkani Wistar – 6 týdnů krmení ST-1)

5.1.1.2 Váhy jater a obsah triacylglycerolu a cholesterolu v játrech

Absolutní ani relativní váhy jater se nelišily u potkanů kmene Wistar mezi jednotlivými skupinami ani po 3 týdnech ani po 6 týdnech krmení (tab. 7). Potkani kmene Sprague-Dawley krmení ST-1 dietou měli absolutní i relativní váhy jater signifikantně nižší než potkani kmene Wistar krmení stejnou dietou v příslušných časech. Potkani kmene Sprague-Dawley krmení MFD po 3 týdny měli vyšší absolutní i relativní váhu jater oproti kontrolám (ST-1). Při krmení HFD měli tito potkani vyšší pouze relativní váhu jater, nicméně nesignifikantní trend vyšší absolutní váhy byl pozorován i u této skupiny.

Obsah jaterních triacylglycerolů se nelišil mezi kontrolními skupinami (po 3 a 6 týdnech u potkanů kmene Wistar nebo Sprague-Dawley). Krmení MFD a zejména pak HFD vedlo k signifikantnímu nárůstu obsahu TAG v játrech (mimo Sprague-Dawley potkany krmené MFD po dobu 6 týdnů, kde byl pozorován pouze nesignifikantní trend). Obsah jaterních TAG se zvyšoval s rostoucím obsahem tuku v dietě a dobou krmení. Podobně i obsah cholesterolu v játrech byl signifikantně vyšší u potkanů krmených MFD a HFD oproti ST-1 dietě ve všech experimentálních skupinách (krmení 3 a 6 týdnů, Wistar a Sprague-Dawley potkani).

	Wistar - 3 týdny			Sprague-Dawley - 3 týdny			Wistar - 6 týdnů			Sprague-Dawley - 6 týdnů		
	ST-1	MFD	HFD	ST-1	MFD	HFD	ST-1	MFD	HFD	ST-1	MFD	HFD
Absolutní váha jater [g]	11,2±1,6	11,3±0,7	10,8±0,8	8,3±0,9 ##	9,5±0,8 *	10,9±2,3	12,5±1,3	11,8±2,0	14,0±1,4	9,9±1,7 +	8,3±1,1	11,2±1,3
Relativní váha jater [%]	3,3±0,5	3,2±0,1	3,2±0,1	2,5±0,1 ##	2,9±0,1 *	3,0±0,3 **	2,8±0,2	3,0±0,4	3,2±0,2	2,4±0,1 +++	2,4±0,2	2,5±0,1
Obsah TAG [mg/g]	5,0±1,1	22,5±5,8 ***	25,0±9,1 ***	6,4±2,5	20,4±18,0 *	36,1±15,3 ***	9,3±1,7	24,4±17,2 *	45,9±11,2 ***	7,1±2,6	16,4±7,3	42,8±17 ***
Obsah cholesterolu [mg/g]	1,8±0,5	4,9±2,0 ***	4,7±0,9 ***	2,2±0,6	5,5±1,5 ***	5,5±2,1 ***	1,7±0,4	3,3±1,4 **	6,5±1,1 ***	1,6±0,3	3,1±1,2 **	5,2±1,5 ***

Tabulka 7 – Váhy jater a obsah TAG a cholesterolu v játrech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ± SD. (n=5-7; * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 vs. ST-1 v odpovídající skupině; ## p<0,01 vs. potkani Wistar - 3 týdny krmení ST-1; + p<0,05, +++ p<0,001 vs. potkani Wistar – 6 týdnů krmení ST-1)

5.1.1.3 Markery oxidačního stresu v játrech

3týdenní krmení HFD ($p<0,05$) u potkanů kmene Wistar a oběma dietami s vyšším obsahem tuků [MFD ($p<0,05$) a HFD ($p<0,001$)] u Sprague-Dawley potkanů vedlo k signifikantnímu poklesu obsahu GSH v játrech oproti příslušným kontrolám (ST-1). Tento jev však nebyl pozorován po 6 týdnech podávání pokusných diet (tab. 8).

U potkanů kmene Sprague-Dawley vedlo 3týdenní podávání MFD a HFD k nárůstu obsahu MDA v játrech. Podobný, ale nesignifikantní, nárůst byl pozorován i u kmene Wistar při 3týdenním krmení. Při krmení po dobu 6 týdnů došlo k signifikantnímu nárůstu obsahu jaterního MDA u obou kmenů potkanů pouze u HFD.

	Wistar - 3 týdny			Sprague-Dawley - 3 týdny			Wistar - 6 týdnů			Sprague-Dawley - 6 týdnů		
	ST-1	MFD	HFD	ST-1	MFD	HFD	ST-1	MFD	HFD	ST-1	MFD	HFD
Obsah GSH [mmol/kg]	13,3 ±1,5	11,8 ±2,5	8,7 ±1,3 *	17,4 ±1,6	13,6 ±2,3 *	11,5 ±1,7 ***	13,5 ±2,8	13,9 ±1,4	12,9 ±2,1	13,4 ±0,6	15,1 ±1,7	12,2 ±1,9
Obsah MDA [nmol/mg proteinu]	0,24 ±0,08	0,81 ±0,24	0,36 ±0,08	0,39 ±0,05	1,6 ±0,48 ***	1,1 ±0,12 **	0,47 ±0,17	0,92 ±0,36	1,28 ±0,4 ***	0,47 ±0,14	0,47 ±0,14	1,03 ±0,42 *
Obsah IL-6 [ng/mg proteinu]	2,3 ±0,6	2,8 ±0,7	3,9 ±0,7 **	2,6 ±0,4	3,4 ±0,5	4,1 ±0,8 ***	2,7 ±0,4	4,9 ±1,3 **	3,8 ±0,6	2,1 ±0,2	2,8 ±0,6	2,9 ±0,7
Obsah TGFβ1 [ng/mg proteinu]	0,53 ±0,2	0,67 ±0,11	0,66 ±0,14	0,40 ±0,01	0,40 ±0,06	0,38 ±0,05	0,44 ±0,13	0,46 ±0,08	0,44 ±0,06	0,45 ±0,03	0,44 ±0,06	0,47 ±0,09

Tabulka 8 – Markery oxidačního stresu a obsah cytokinů v játrech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ± SD. (n=5-7; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ vs. ST-1 v odpovídající skupině)

5.1.1.4 Obsah cytokinů v játrech

Krmení dietami s vyšším obsahem tuků vedlo k nárůstu jaterní koncentrace IL-6, signifikantní nárůst byl pozorován u obou kmenů potkanů při 3týdenním krmení HFD a u potkanů kmene Wistar při krmení MFD po dobu 6 týdnů (tab. 8).

Žádná z pokusných skupin se nelišila v obsahu TGFβ1 v játrech.

V rámci pokusu jsme plánovali stanovit i sérové koncentrace těchto cytokinů, nicméně tyto koncentrace byly pod detekční mezí použitých ELISA kitů (31,3 pg/ml pro IL-6 a 0,47 ng/ml pro TGFβ1).

5.1.1.5 Sérové biochemické parametry

Mezi pokusnými skupinami jsme nepozorovali signifikantní rozdíly v aktivitě ALT a AST, ani v koncentraci celkového cholesterolu (tab. 9). Rovněž jsme nezjistili rozdíly v glykémii mimo nižší glykémii u kontrolních (ST-1) Sprague-Dawley potkanů po 3 týdnech oproti potkanům kmene Wistar (ST-1 skupina, 3 týdny krmení).

Překvapující byl pokles koncentrace sérových TAG při 3týdenním i 6týdenním krmení dietami s vyšším obsahem tuků (MFD a HFD) oproti příslušným ST-1 kontrolám (pouze u Wistar potkanů po 3 týdnech krmení HFD jsme pozorovali nesignifikantní trend poklesu). Rovněž jsme našli u kontrolních (ST-1) potkanů kmene Sprague-Dawley téměř poloviční koncentrace sérových TAG oproti kontrolním potkanům kmene Wistar ($p<0,01$).

	Wistar - 3 týdny			Sprague-Dawley - 3 týdny			Wistar - 6 týdnů			Sprague-Dawley - 6 týdnů		
	ST-1	MFD	HFD	ST-1	MFD	HFD	ST-1	MFD	HFD	ST-1	MFD	HFD
Glykémie [mmol/l]	8.5 ±1.6	9.5 ±0.5	8.2 ±0.9	6.4 ±1.2 #	7.7 ±0.6	7.7 ±0.8	8.1 ±0.4	7.6 ±0.8	7.8 ±0.9	7.0 ±1.3	6.5 ±0.7	7.4 ±0.7
TAG [mmol/l]	0.95 ±0.33	0.46 ±0.10 **	0.59 ±0.23	0.49 ±0.18 ##;+	0.29 ±0.12 *	0.25 ±0.07 *	0.88 ±0.37	0.24 ±0.10 ***	0.34 ±0.09 ***	0.47 ±0.14 ##;+	0.31 ±0.09 *	0.30 ±0.12 *
Celkový cholesterol [mmol/l]	1.55 ±0.18	1.52 ±0.40	1.57 ±0.27	1.39 ±0.18	1.22 ±0.25	1.12 ±0.43	1.34 ±0.19	1.30 ±0.32	1.41 ±0.36	1.28 ±0.38	0.91 ±0.26	1.04 ±0.35
ALT [mkat/l]	0.81 ±0.08	0.73 ±0.06	0.58 ±0.11	0.88 ±0.12	0.93 ±0.26	0.81 ±0.20	0.75 ±0.17	0.99 ±0.20	0.91 ±0.16	0.87 ±0.20	1.00 ±0.18	1.67 ±1.66
AST [mkat/l]	1.69 ±0.30	1.83 ±0.48	2.22 ±0.78	2.27 ±0.91	2.80 ±1.01	1.77 ±0.30	1.60 ±0.12	2.10 ±0.41	1.88 ±0.49	2.59 ±1.10	2.24 ±0.72	2.53 ±1.08

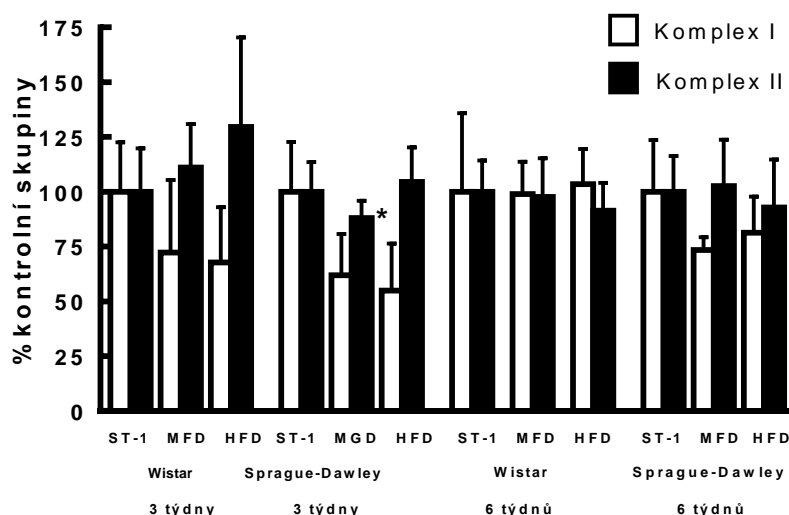
Tabulka 9 – Sérové charakteristiky. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ± SD. (n=5-7; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ vs. ST-1 v odpovídající skupině; # $p<0,05$, ## $p<0,01$ a ### $p<0,001$ vs. potkani Wistar - 3 týdny krmení ST-1; + $p<0,05$ vs. potkani Wistar – 6 týdnů krmení ST-1)

5.1.1.6 Respirace izolovaných mitochondrií

Signifikantní pokles respirace izolovaných mitochondrií ve stavu 3 při použití substrátů pro komplex I jsme pozorovali u Sprague-Dawley potkanů krmených HFD po dobu 3 týdnů ($p<0,05$) (graf 1). Nesignifikantní trend poklesu této respirace byl pozorován při krmení MFD u těchto potkanů a rovněž u Wistar potkanů krmených po dobu 3 týdnů MFD a HFD.

Respirace mitochondrií při použití substrátů komplexu II ve stavu 3 nebyla ovlivněna v žádné z pokusných skupin.

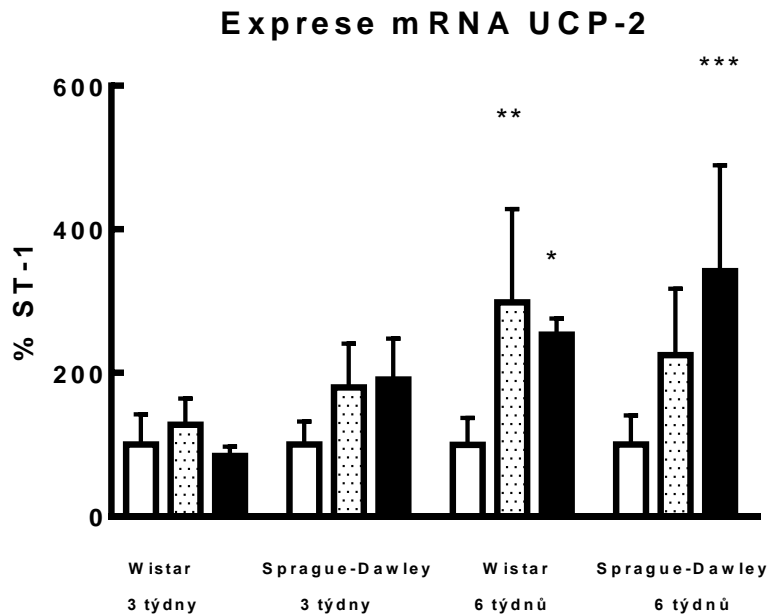
Respirace ve stavu 3 při použití substrátů komplexu I a II



Graf 1 – Spotřeba kyslíku izolovanými mitochondriemi ve stavu 3 při použití substrátů komplexu I resp. komplexu II. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SD. (n=4-6; * $p < 0,05$ vs. odpovídající ST-1 skupina).

5.1.1.7 Expres *uncoupling* proteinu 2

Expres mRNA pro *uncoupling* protein 2 byla signifikantně zvýšena pouze při 6týdenním krmení dietami s vyšším obsahem tuku (graf 2). K signifikantnímu nárůstu exprese došlo u kmene Wistar u obou těchto diet ($p < 0,01$ pro MFD, $p < 0,05$ pro HFD), u kmene Sprague-Dawley bylo signifikantní zvýšení pouze u HFD ($p < 0,001$), u MFD byl pozorován pouze nesignifikantní trend.

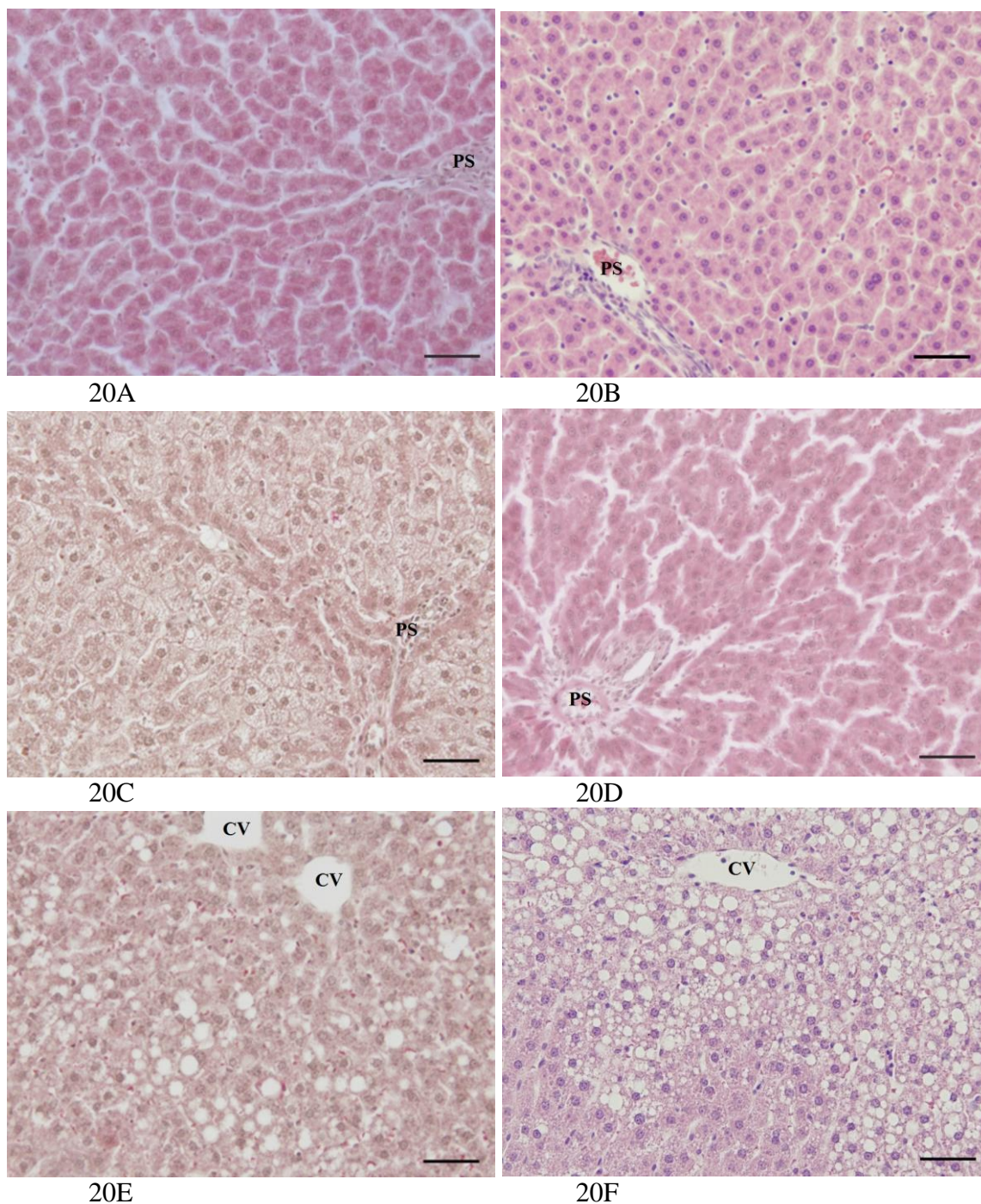


Graf 2 – Expresa UCP-2 v játrech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry \pm SD. (n=5-7; * $p<0,05$ ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ vs. odpovídající ST-1 skupina)

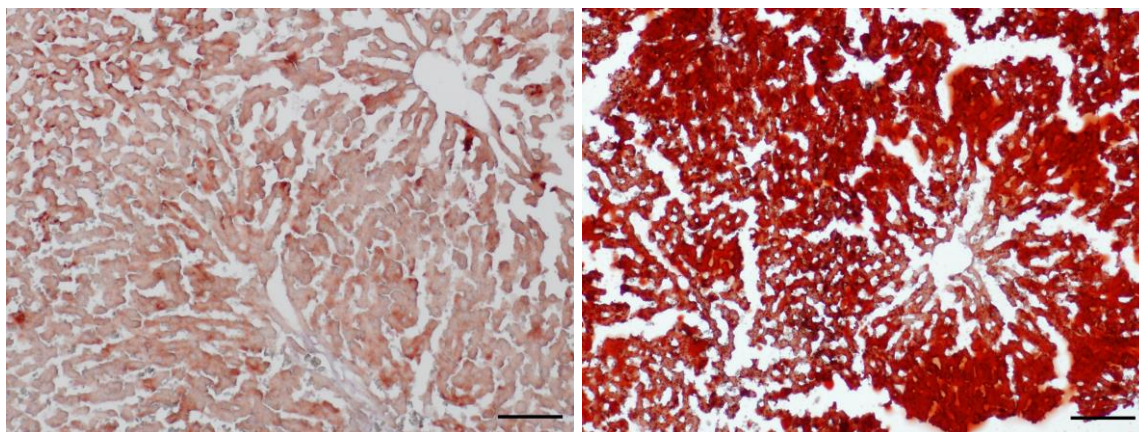
5.1.1.8 Histologické změny navozené dietami

Histologické nálezy jater všech kontrolních (ST-1) skupin (obr. 20A a B) nevykazovaly žádnou patologii (bez přítomnosti steatózy, zánětu či nekrózy). Žádná z diet s vyšším obsahem tuků nevedla v žádné pokusné skupině ke vzniku zánětu ani jaterní nekrózy. Zatímco u kmene Wistar MFD indukovala prostou mikrovezikulární steatózu (po 3 i 6 týdnech, obr. 20C), u kmene Sprague-Dawley tato dieta nevedla ke vzniku viditelné steatózy (obr. 20D). HFD vedla u obou kmenů potkanů ke vzniku prosté mikrovezikulární steatózy po 3 týdnech a ke vzniku mikrovezikulární či míšené steatózy po 6 týdnech (obr. 20E a F).

Přítomnost jaterní steatózy ve zmražených řezech byla u vybraných preparátů ověřena pomocí speciálního histologického barvení na tuky (olejová červeň, obr. 21A a B). Histologické nálezy (stupeň steatózy, přítomnost zánětu a hepatocelulárních nekróz) jsou semikvantitativně sumarizovány v tabulce 10.



Obrázek 20 A - F – Histologické preparáty jater z potkanů kmene Wistar (20 A, C, E) a Sprague-Dawley (20B, D, E) krmených ST-1 (20A, B), MFD (20C, D) a HFG (20E, F) po dobu 6 týdnů. (CV – centrální žíla, PS – periportální prostory. Barvení hematoxylin-eosinem, měřítko - 50 μ m)



21A

21B

Obrázek 21A - B – Histologické preparáty zamražených jater obarvené olejovou červení. Potkani kmene Wistar krmení ST-1 (21A), resp. HFD (21B) po dobu 6 týdnů. (zvětšení objektivu 10x).

	Wistar - 3 týdny			Sprague-Dawley - 3 týdny			Wistar - 6 týdnů			Sprague-Dawley - 6 týdnů		
	ST-1	MFD	HFGD	ST-1	MFD	HFD	ST-1	MFD	HFD	ST-1	MFD	HFD
Steatóza	1,0±0	3,3±0,5 ***	3,3±0,8 ***	1,0±0	1,6±0,7 ###	2,4±1,1 *	1,0±0	2,9±0,9 ***	3,1±0,8 ***	1,0±0	1,4±0,5 ++	2,9±0,7 ***
Zánět	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1±0,4
Nekróza	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabulka 10 – Semikvantitativní hodnocení steatózy, zánětu a nekrózy. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry ± SD. (n=5-7; * p<0,05, *** p<0,001 vs. ST-1 v odpovídající skupině; ### p<0,001 vs. Wistar potkani krmení MFD 3 týdny; ++ p<0,01 vs. potkani Wistar krmení MFD 6 týdnů)

5.1.2 Vliv prosté jaterní steatózy u potkana na regeneraci jater po parciální hepatektomii

Pozn.: Vzhledem k tomu, že jsme nezjistili žádné rozdíly mezi kontrolními skupinami zvířat krmených ST-1 resp. HFD a příslušnými laparotomovanými skupinami (*sham* operace) za 24, 48 ani 72 hodiny, uvádíme pouze výsledky zvířat po parciální hepatektomii vůči příslušné kontrolní skupině krmené ST-1 nebo HFD.

5.1.2.1 Sérové biochemické parametry

Parciální hepatektomie navodila mírné poškození jater potkanů na obou typech diet, což se projevilo nárůstem sérových aktivit transamináz a ALP a koncentrace celkového bilirubinu (tab. 11). U zvířat krmených ST-1 dietou jsme pozorovali časnější zvýšení markerů jaterního poškození po PHx - ALT za 24h ($p < 0,001$), AST za 24 h ($p < 0,001$) a 48 h ($p < 0,05$) a ALP za 24 h a 48 h ($p < 0,05$). U potkanů na HFD došlo k nárůstu aktivity ALT až za 72 h ($p < 0,05$), ALP za 48 h ($p < 0,05$) a 72 h ($p < 0,001$) a koncentrace celkového bilirubinu až po 72 h ($p < 0,05$).

Dieta	ST-1	ST-1	ST-1	ST-1	HFD	HFD	HFD	HFD
PHx	-	24h	48h	72h	-	24h	48h	72h
ALT (μkat/l)	0,7±0,1	4,6±3,3 ***	2,2±1,9	1,4±0,4	0,9±0,3	1,8±0,5	1,2±0,4	2,5±1,1 #
AST (μkat/l)	1,9±0,2	7,7±2,7 ***	4,4±1,7 *	2,6±0,5	2,2±0,3	4,9±1,9	3,2±1,4	3,5±1,2
ALP (μkat/l)	2,3±0,4	5,1±1,8 *	5,3±2,2 *	4,0±0,8	2,5±0,4	4,8±1,0	5,3±1,8 #	6,9±1,2 ### \$
Celkový bilirubin (μmol/l)	1,8±0,4	6,8±5,0	7,3±6,1	5,7±1,6	1,8±1,0	5,2±1,2	5,3±2,9	6,0±2,4 #

Tabulka 11 – Sérové změny vyvolané PHx. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD. (n=6; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. ST-1; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ vs HFD; \$ $p < 0,05$ vs. odpovídající ST-1 skupina)

5.1.2.2 Váhy jater a obsah triacylglycerolu a cholesterolu v játrech

Parciální hepatektomie indukovala signifikantní snížení absolutní i relativní váhy jater za 24 h u obou experimentálních diet bez rozdílu mezi ST-1 a HFD (tab. 12). Obsah TAG v játrech kontrolních HFD potkanů byl cca 7x vyšší než u potkanů krmených ST-1

dietou. PHx u ST-1 krmených zvířat vedla po 24 hodinách k signifikantnímu zvýšení obsahu jaterních TAG ($p<0,05$), který v následujících časových intervalech postupně klesal. U HFD nevedla PHx k signifikantním změnám v obsahu TAG, přestože došlo k mírnému, nesignifikantnímu zvýšení TAG v játrech. Obsah cholesterolu v játrech kontrolních potkanů krmených HFD byl signifikantně vyšší než u potkanů na ST-1 dietě. PHx u HFD potkanů vedla ke snížení obsahu cholesterolu v játrech ve všech sledovaných časových intervalech, tento jev nebyl pozorován u ST-1 diety.

Dieta PHx	ST-1 -	ST-1 24h	ST-1 48h	ST-1 72h		HFD -	HFD 24h	HFD 48h	HFD 72h
Váha jater [g]	11,0±1,2	5,7±0,7 **	6,5±0,7	7,2±0,5		12,0±2,5	5,2±0,5 ###	7,5±1,5	7,3±1,0
Relativní váha jater [%]	2,5±0,1	1,3±0,1 ***	1,6±0,1	1,8±0,1		2,6±0,2	1,3±0,1 ###	1,7±0,2	1,9±0,1
Obsah TAG (mmol/kg)	7,0±3,9	50,0±21,9 *	28,0±8,2	26,2±9,2		48,3±20,0 *	53,6±18,5	60,4±10,1	53,6±9,7
Obsah cholesterolu (mmol/kg)	7,1±2,0	9,0±2,6	7,8±0,9	8,2±1,1		31,8±8,7 ***	19,0±6,6 ### \$	20,4±4,9 ## \$\$\$	15,1±3,1 ###

Tabulka 12 – Vliv PHx na váhy jater a obsah TAG a cholesterolu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD. (n=6; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ vs. ST-1; ## $p<0,01$, ### $p<0,001$ vs. HFD; \$ $p<0,05$, \$\$\$ $p<0,001$ vs. odpovídající ST-1 skupina)

5.1.2.3 Redoxní stav jater a lipoperoxidace

Játra kontrolních HFD potkanů měla signifikantně nižší obsah GSH ($p<0,05$) a vyšší obsah MDA ($p<0,001$) než játra kontrolních ST-1 potkanů (tab. 13). Proces regenerace navozený PHx vedl u obou typů diet ke zvýšení obsahu GSH a poměru GSH/GSSG v játrech a ke snížení obsahu MDA. Nárůst jaterního GSH byl u ST-1 potkanů pouze za 24 h po PHx, nicméně zvýšení GSH/GSSG poměru bylo pozorováno u těchto potkanů ve všech sledovaných časových intervalech. U zvířat krmených HFD jsme pozorovali zvýšení obsahu GSH za 24 a 72 h a ke změně poměru redukováného a oxidovaného glutathionu došlo za 48 a 72 h. K signifikantnímu poklesu MDA v játrech po PHx došlo pouze potkanů krmených HFD, a to za 24, 48 i 72 h po PHx.

Dieta	ST-1	ST-1	ST-1	ST-1		HFD	HFD	HFD	HFD
PHx	-	24h	48h	72h		-	24h	48h	72h
Jaterní GSH (mmol/kg)	15,1±2,8	21,6±4,1 **	19,0±2,1	17,4±2,5		9,6±3,6 *	16,6±2,0 ##	14,6±2,8	18,6±1,0 ###
Poměr GSH/GSSG	9,4±0,8	10,8±0,8 *	10,7±0,4 *	11,4±0,7 ***		9,3±1,0	10,0±0,8	10,9±0,5 #	12,8±0,4 ### \$
Obsah MDA (nmol/g liver)	28,2±2,8	18,6±5,3	11,1±6,2	22,6±1,9		72,1±17,9 ***	30,9±14,0 ###	36,2±11,8 ### \$	47,5±11,0 ## \$

Tabulka 13 – Vliv PHx na obsah GSH, poměr GSH/GSSG a obsah MDA. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD. (n=6; * p<0,05, ** p<0,01, *** p< 0,001 vs. ST-1; # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001 vs. HFD; \$ p<0,05 a \$\$ p<0,01 vs. odpovídající ST-1 skupina)

5.1.2.4 Obsah cytokinů v játrech po parciální hepatektomii

Nepozorovali jsme žádné rozdíly v obsahu jaterních cytokinů mezi kontrolními ST-1 a HFD potkany (tab. 14). PHx navodila signifikantní zvýšení obsahu jaterního IL-6 pouze u HFD potkanů za 24 hodiny (p<0,05). Podobný, leč nesignifikantní, trend byl pozorován i u ST-1 potkanů. PHx nevedla k signifikantním změnám v obsahu TGF-β1 v játrech, nicméně byl zřejmý trend snížení jeho obsahu za 24 a 48 h po PHx u obou experimentálních diet.

Dieta	ST-1	ST-1	ST-1	ST-1		HFD	HFD	HFD	HFD
PHx	-	24h	48h	72h		-	24h	48h	72h
Jaterní IL-6 (pg/mg protein)	14,6±6,6	20,7±2,0	20,4±6,6	N/A		16,1±4,6	25,3±2,4 #	20,8±3,9	N/A
Jaterní TGF-β1 (pg/mg protein)	15,7±2,7	10,3±1,3	10,6±3,7	17,1±5,6		16,3±6,9	10,3±3,2	10,7±2,5	18,7±5,0

Tabulka 14 – Vliv PHx na obsah jaterních cytokinů. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD. (n=6; # p<0,05 vs. HFD)

5.1.2.5 Obsah DNA v játrech po parciální hepatektomii

Odstranění 2/3 jater navodilo pokles absolutního a relativního obsahu DNA v játrech 24 h po chirurgickém zákroku (Tab. 15). Ke změnám v celkovém obsahu DNA v játrech došlo u obou typů diet po PHx (p<0,001), relativní obsah DNA byl snížen signifikantně pouze u ST-1 diety 24 h po PHx (p<0,05), nesignifikantní trend snížení byl

pozorován ve stejném časovém intervalu i u HFD (šlo o pokles na stejné hodnoty, nicméně díky vyšší směrodatné odchylce tato změna nebyla signifikantní).

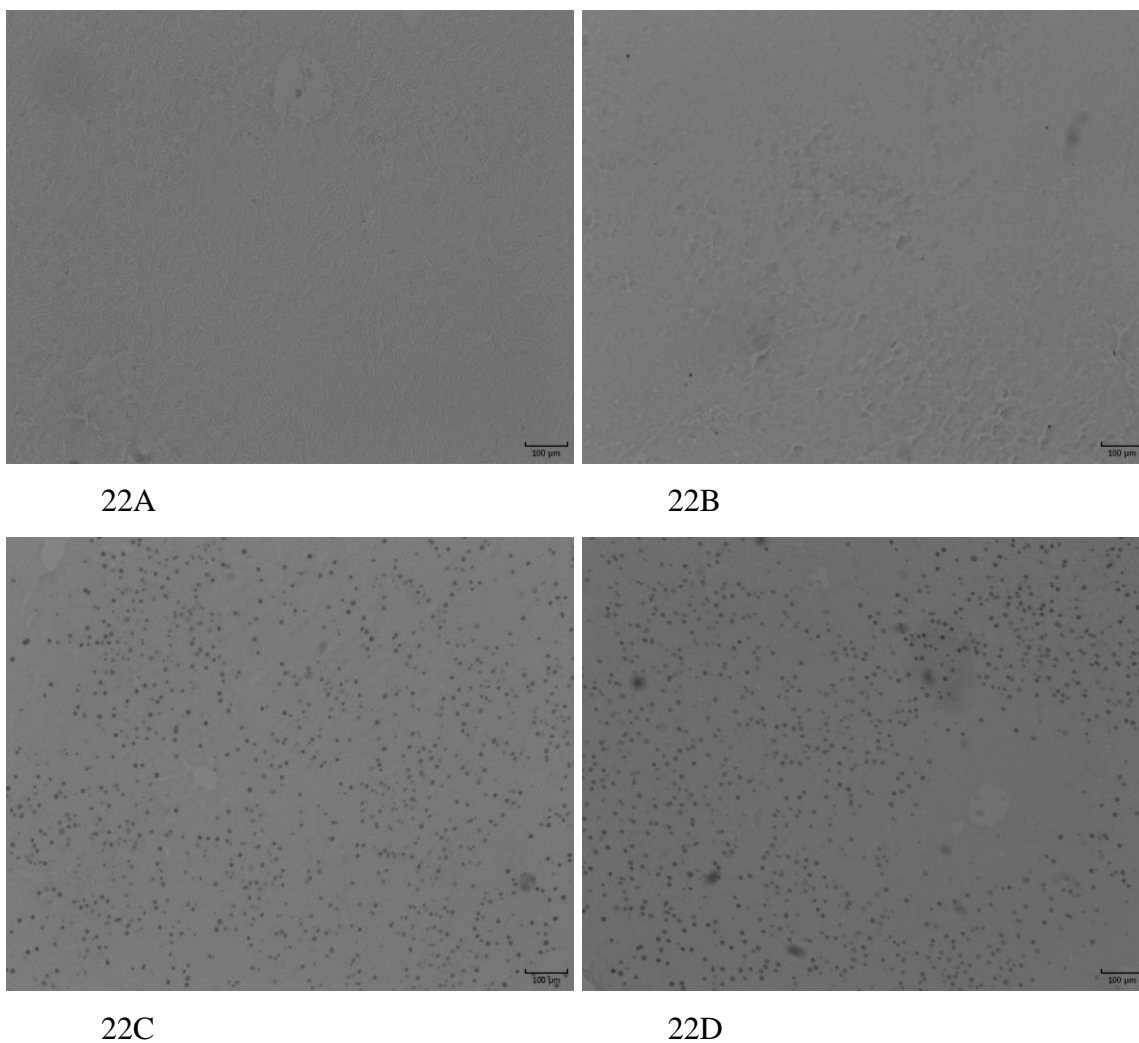
Dieta	ST-1	ST-1	ST-1	ST-1		HFD	HFD	HFD	HFD
PHx	-	24h	48h	72h		-	24h	48h	72h
Obsah DNA [mg DNA/g jater]	1,7±0,1	1,2±0,1 *	1,2±0,4	1,7±0,1		1,7±0,1	1,2±0,2	1,5±0,6	1,5±0,2
Celkový obsah DNA [mg DNA/liver]	18,6±1,5	6,8±0,9 ***	9,2±3,2	12,5±1,1		18,7±1,8	6,0±0,8 ###	9,2±1,9	11,2±2,1

Tabulka 15 – Vliv PHx na obsah DNA v játrech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD. (n=6; * p<0,05, *** p< 0,001 vs. ST-1; ### p<0,001 vs. HFD)

5.1.2.6 Jaterní histologie a inkorporaci bromdeoxyuridinu do DNA hepatocytů po parciální hepatektomii

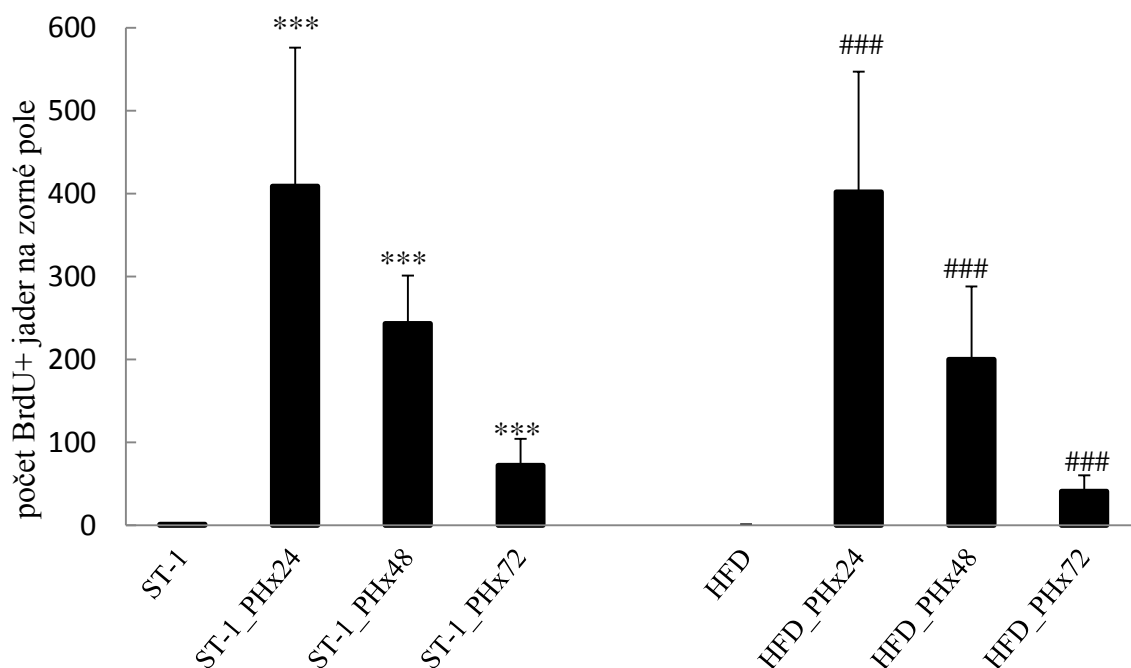
Játra potkanů krmených HFD vykazovala prostou mikrovezikulární steatózu. Na mikrofotografiích nebyly vidět známky zánětlivé reakce, nekrózy ani fibrotické změny (mikrofotografie nejsou prezentovány). Steatotické změny u kontrolní skupiny krmené HFD, ale i 24 h po PHx u ST-1 skupiny byly potvrzeny barvením zmražených řezů pomocí olejové červeně.

Pro hodnocení regenerační odpovědi jsme histopatologické preparáty imunohistochemicky obarvili a semikvantitativně hodnotili inkorporaci BrdU do jaderné DNA hepatocytů (graf 3). Kontrolní vzorky nesteatotických a steatotických jater obsahovaly ojediněle značená jádra (obr. 22A - B), naproti tomu maxima syntézy DNA jsme pozorovali u obou skupin (ST-1 i HFD, p<0,001) 24 h po PHx (obr. 22C - D, graf 3). V dalších časových intervalech docházelo postupně ke snižování počtu BrdU-pozitivních jader u obou skupin. Mezi ST-1 a HFD skupinami po PHx jsme nepozorovali signifikantní rozdíly v počtu BrdU+ jader na zorné pole mikroskopu v odpovídajících časových intervalech, nicméně u HFD skupiny 24 h po PHx jsme zaznamenali daleko zřetelnější zonální uspořádání syntézy DNA s absencí BrdU+ jader v centrilobulárních zónách (obr. 22D).



Obrázek 22A - D – Imunohistochemické barvení DNA s inkorporovaným BrdU. Preparáty jater kontrolních potkanů (A, B) a potkanů 24 hodiny po PHx (C, D) krmených ST-1 (A, C), resp. HFD (B, D) po dobu 6 týdnů (měřítko - 100 µm).

Inkorporace BrdU do DNA hepatocytů



Graf 3 – Semikvantitativní hodnocení syntézy DNA pomocí inkorporace BrdU do jader hepatocytů. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. (***) $p < 0,001$ vs. ST-1 skupina; (###) $p < 0,001$ vs. HFD skupina)

5.1.2.7 Respiraci mitochondrií v jaterním homogenátu

Přestože jsme pravděpodobně díky malému počtu vzorků ve skupině ($n=3-4$) nepozorovali žádné signifikantní změny mezi ST-1 a HFD skupinami po PHx v žádném ze sledovaných parametrů (tab. 16), 24 a 48 h po parciální hepatektomii došlo u obou typů diet k nesignifikantnímu zvýšení respirace ve stavu 3 při použití substrátů komplexu I. Při použití substrátů komplexu II jsme tento trend nepozorovali. Index respirační kontroly pro komplex II se zvýšil pouze nesignifikantně, a to za 24 h po PHx u obou skupin.

Spotřeba O ₂	ST-1	ST-1_PHx 24h	ST-1_PHx 48h	ST-1_PHx 72h	HFD	HFD_PHx 24h	HFD_PHx 48h	HFD_PHx 72h
Stav 3 (Glu + Mal + ADP)	100.0 ±23.7	145.0 ±28.8	167.6 ±58.7	91.4 ±18.1	92.1 ±36.6	160.6 ±36.5	156.5 ±19.9	58.4 ±9.0
Stav 3 (Suk + ADP)	100.0 ±24.9	104.9 ±19.0	112.4 ±33.2	85.0 ±13.1	102.3 ±2.4	103.7 ±29.9	112.8 ±30.6	100.3 ±13.0
RCI pro komplex II	2.9 ±0.6	5.5 ±1.1	3.2 ±0.3	2.1 ±0.3	4.0 ±0.6	5.8 ±0.7	4.5 ±1.2	2.3 ±0.2

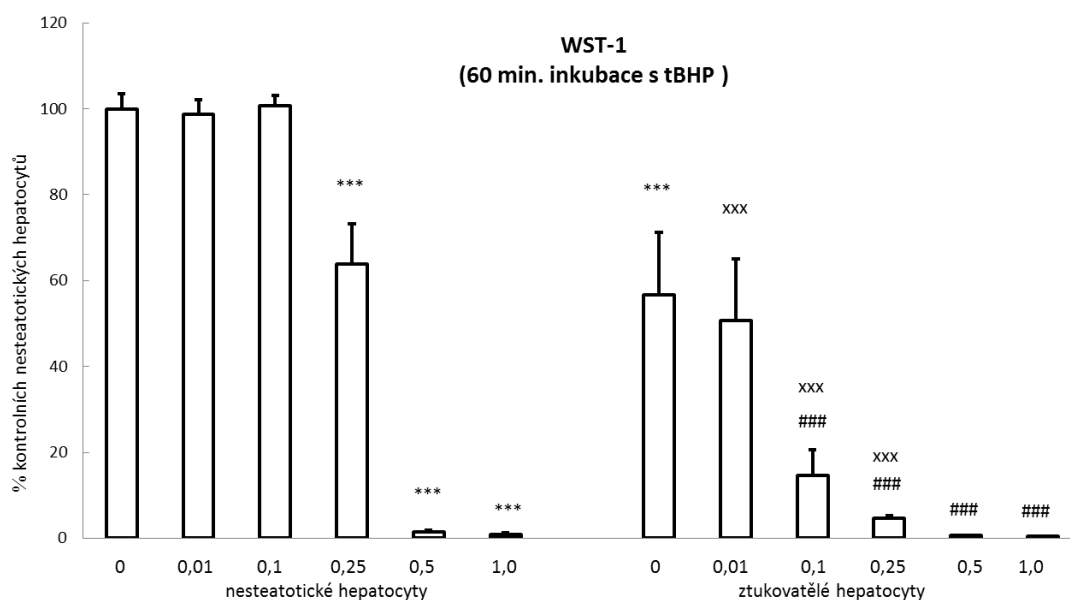
Tabulka 16 – Respirace homogenátu jater po PHx. Hodnoty stavu 3 jsou uvedeny jako průměry % kontrol ± SD, kde 100 % odpovídá respiraci homogenátu kontrolní ST-1 skupiny. (n = 3 – 4; Glu – glutamát, Mal – malát, Suk - sukcinát).

5.2 Výsledky pokusů *in vitro*

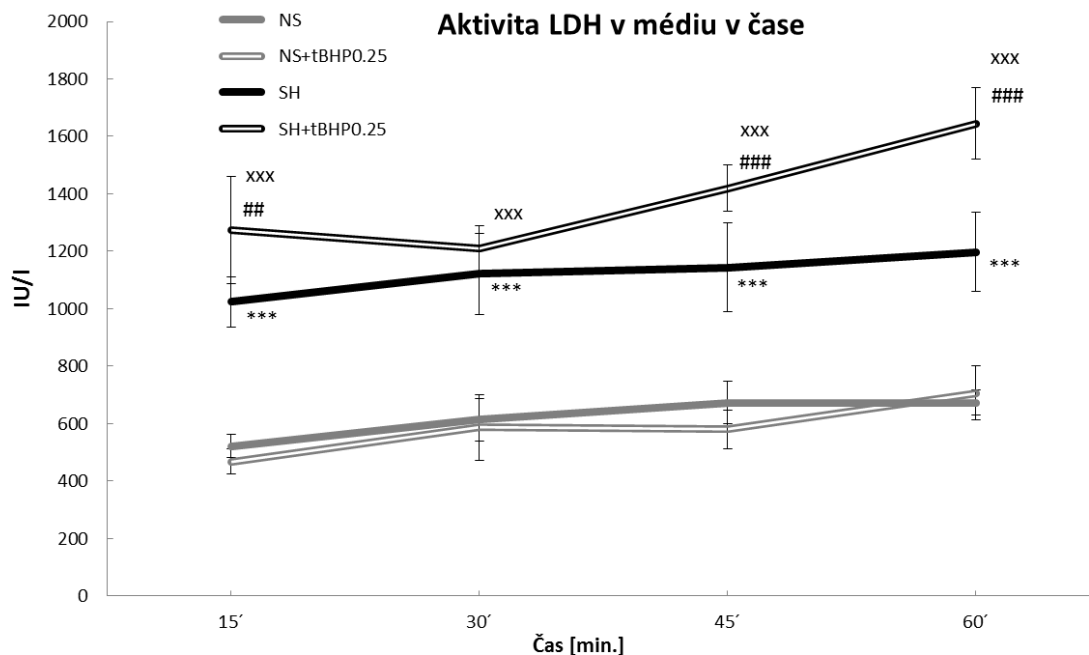
5.2.1 Porovnání účinku terciárního-butyldihydroperoxidu na steatotické a nesteatotické hepatocyty *in vitro*

5.2.1.1 Viabilita steatotických a neztukovatělých hepatocytů potkana

Hepatocyty izolované ze steatotických jater vykazovaly nižší aktivity buněčných dehydrogenáz (graf 4) v porovnání s hepatocyty izolovanými z neztukovatělých jater. V médiu kontrolních steatotických hepatocytů jsme rovněž naměřili vyšší aktivity LDH než v médiu neztukovatělých hepatocytů (graf 5 a graf 7). tBHP indukoval na dávce (graf 4) a čase (graf 5) závislé poškození hepatocytů. Pokles v aktivitách celulárních dehydrogenáz nastává u steatotických buněk již od 0,1 mM koncentrace tBHP ($p < 0,001$, WST-1, graf 4), na rozdíl od nesteatotických hepatocytů, kde byl signifikantní pokles zaznamenán až od 0,25 mM tBHP při 60 minutové expozici. Aktivita LDH v médiu steatotických hepatocytů byla signifikantně vyšší než u intaktních kontrol již za 15 min. po expozici 0,25 mM tBHP ($p < 0,01$), zatímco 0,25 mM tBHP u neztukovatělých hepatocytů nevyvolal změnu aktivity LDH v čase do 60 min (graf 5).



Graf 4 – Aktivita buněčných dehydrogenáz po 60min. expozici hepatocytů 0-1 mM tBHP. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. (n=8; *** $p < 0,001$ vs. nesteatotická kontrolní skupina; ### $p < 0,001$ vs. steatotická kontrolní skupina; xxx $p < 0,001$ vs. odpovídající nesteatotická skupina)



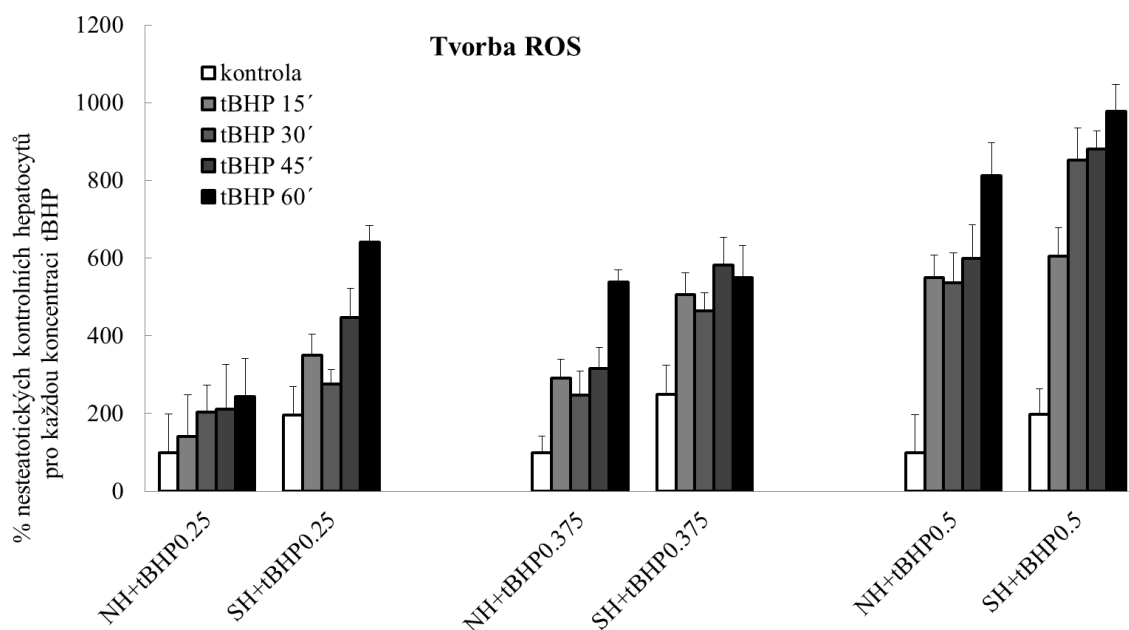
Graf 5 – Aktivita LDH v kultivačním médiu nesteatotických (NS) a steatotických hepatocytů (SH) po expozici 0,25 mM tBHP. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. (n=6; *** $p < 0,001$ vs. nesteatotická kontrolní skupina; ## $p < 0,01$ a ### $p < 0,001$ vs. steatotická kontrolní skupina v příslušném čase; xxx $p < 0,001$ vs. nesteatotická skupina v příslušném čase)

5.2.1.2 Produkce reaktivních kyslíkových derivátů v steatotických a neztukovatělých hepatocytech potkana

Kontrolní steatotické hepatocyty vykazují známky zvýšeného oxidačního stresu oproti kontrolním neztukovatělým hepatocytům. Ve steatotických hepatocytech je již za klidových podmínek vyšší produkce ROS (graf 6), nižší poměr GSH k celkovému glutathionu (graf 12) a v kultivačním médiu těchto hepatocytů nacházíme vyšší koncentraci MDA (graf 11).

Tvorba ROS je závislá na dávce tBHP a délce expozice tomuto induktoru oxidačního stresu a je více vyjádřena ve ztukovatělých hepatocytech (graf 6). Rovněž produkce MDA do kultivačního média steatotických hepatocytů inkubovaných s 0,25 mM

tBHP po dobu 30 min. je téměř 2x vyšší než u odpovídající skupiny neztukovatělých hepatocytů (graf 11). Zatímco u nesteatotických hepatocytů 0,25 mM tBHP nezpůsobil změnu v poměru GSH k celkovému glutathionu, u ztukovatělých hepatocytů došlo k poklesu tohoto poměru na 66 %. Ještě výraznější rozdíl jsme pozorovali při použití 0,375 mM tBHP. Zatímco u nesteatotických hepatocytů došlo k poklesu pouze o 5 %, u ztukovatělých hepatocytů byl pokles na 33 % (graf 12).



Graf 6 – Produkce ROS nesteatotickými (NH) a steatotickými (SH) hepatocyty v závislosti na čase inkubace s tBHP a dávce tBHP. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. (n=8; pro větší přehlednost grafu nejsou uvedeny statistické významnosti)

5.2.1.3 Produkce albuminu a mitochondriální membránový potenciál u steatotických a neztukovatělých hepatocytů potkana

Mezi kontrolními neztukovatělými a steatotickými hepatocyty nebyly pozorovány rozdíly v produkci albuminu (graf 9), ani v % hepatocytů s energizovanými mitochondriemi (graf 13, obr. 23A, B). tBHP v koncentracích 0,25 a 0,375 mmol/l snížil významněji produkci albuminu ve steatotických hepatocytech v porovnání s neztukovatělými. Rovněž vliv tBHP na MMP byl výraznější u steatotických hepatocytů (obr. 23 C, D, G, H). K signifikantnímu snížení procenta hepatocytů s vysokým MMP

došlo od koncentrace tBHP 0,375 mmol/l u nesteatotických hepatocytů ($p<0,001$) a od 0,25 mmol/l u ztukovatělých buněk ($p<0,001$) (graf 13).

5.2.1.4 Respirace permeabilizovaných steatotických a nesteatotických hepatocytů

Zatímco respirace hepatocytů ve stavu 4 nebyla rozdílná mezi kontrolními ztukovatělými a nesteatotickými hepatocyty, ve stavu 3 jsme pozorovali snížení konzumpce kyslíku u ztukovatělých hepatocytů oproti nesteatotickým ($p<0,01$, tab. 17). RCI však nebylo signifikantně nižší oproti nesteatotickým kontrolám.

tBHP v koncentraci 0,25 mmol/l vedl po 5 min. inkubaci s permeabilizovanými hepatocyty k obdobnému nesignifikantnímu zvýšení respirace ve stavu 4 u obou skupin (tab. 17) a k signifikantnímu snížení respirace ve stavu 3 i RCR u steatotických a nesteatotických hepatocytů. Pokles konzumpce kyslíku ve stavu 3 byl výraznější u steatotických hepatocytů ($p<0,01$).

	Respirace ve stavu 3 ($\mu\text{mol O}_2/\text{s}/10^6$ buněk)	Respirace ve stavu 4 ($\mu\text{mol O}_2/\text{s}/10^6$ buněk)	RCI pro komplex I
NH (n =11)	1015,5 \pm 145,1	188,5 \pm 44,5	5,4 \pm 1,2
NH+tBHP (n=9)	761,0\pm145,6 *** vs. NH	233,0 \pm 61,6 n.s. vs. NH	3,3\pm0,7 *** vs. NH
SH (n=10)	819,7\pm112,5 ** vs. NH	172,4 \pm 42,5 n.s. vs. NH	4,8 \pm 0,8 n.s. vs. NH
SH+tBHP (n=8)	520,4\pm98,2 ### vs. SH \$\$ vs. NH+tBHP	217,6 \pm 76,0 n.s. vs. SH n.s. vs. NH+tBHP	2,4\pm0,6 ### vs. SH n.s. vs. NH+tBHP

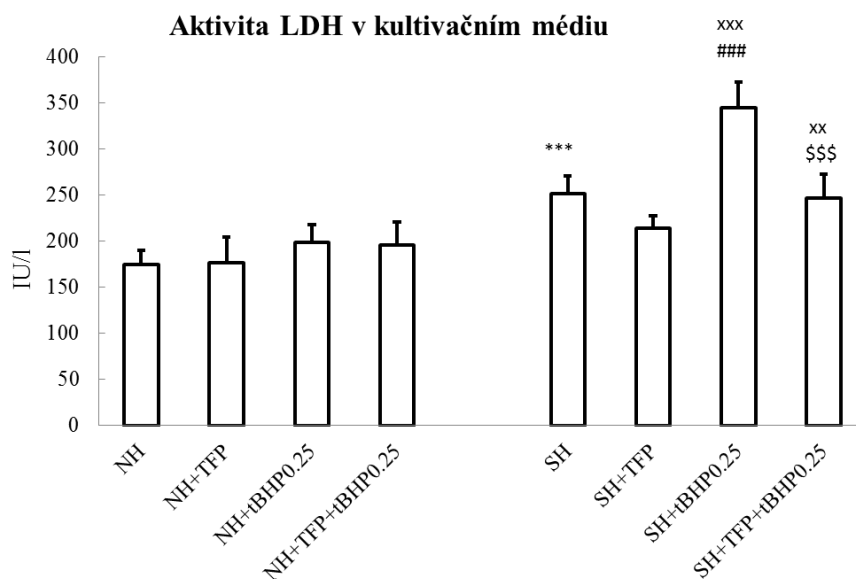
Tabulka 17 – Respirace digitoninem permeabilizovaných nesteatotických (NH) a steatotických (SH) hepatocytů exponovaných 0,25 mM tBHP po dobu 5 min. ve stavu 4 (10mM glutamát + 2.5mM malát) a ve stavu 3 (10mM glutamát + 2.5mM malát + 1.5mM ADP). RCI byl vypočten jako poměr respirace ve stavu 3/stav 4. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. (** $p<0,01$ a *** $p<0,001$ vs. NH; ### $p<0,001$ vs. SH; \$\$ $p<0,01$ vs. NH+tBHP; n.s. - nesignifikantní)

5.2.1.5 Vliv trifluoperazinu na poškození steatotických a nesteatotických hepatocytů navozené terciárním-butyldihydroperoxidem

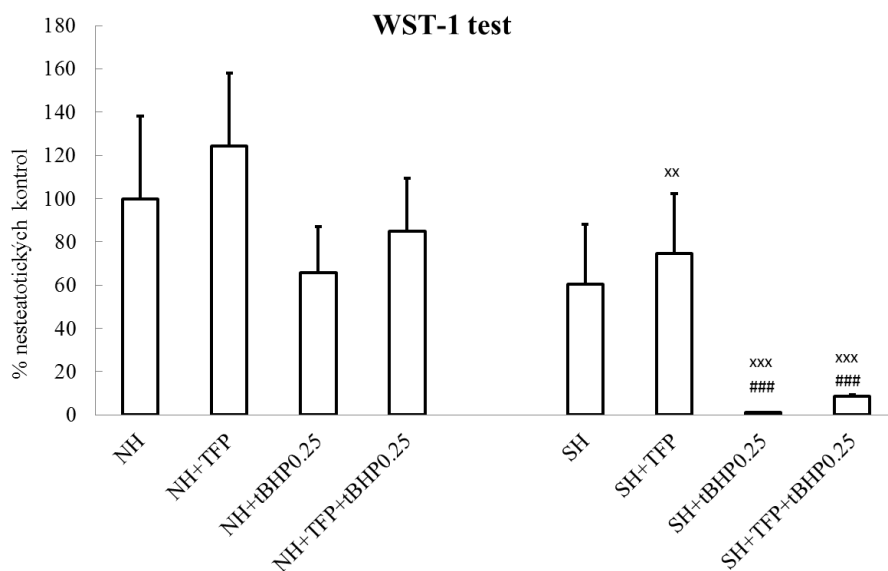
Samotný trifluoperazin (TFP, 5 $\mu\text{mol/l}$, expozice 60 min.) nevykazoval toxický účinek na steatotické ani neztukovatělé hepatocyty (aktivita LDH a aktivita buněčných dehydrogenáz, graf 7 a graf 8). Zajímavým nálezem je zvýšení poměru GSH k celkovému glutathionu v neztukovatělých hepatocytech inkubovaných s TFP (graf 12), podobný trend pozorován i u steatotických hepatocytů. Naopak produkce albuminu byla u obou skupin vlivem TFP snížena (graf 9).

Vliv TFP na toxicitu navozenou tBHP byl testován ve dvou pokusných uspořádáních – 1) současná koinkubace hepatocytů s tBHP a TFP po dobu 30 min. 2) nejprve preinkubace buněk s TFP po dobu 30 min. následovaná koinkubací hepatocytů s tBHP a TFP rovněž po dobu 30 min. Vzhledem k tomu, že TFP byl schopen částečně zabránit účinku tBHP pouze po preinkubaci, uvádíme výsledky pouze tohoto pokusného uspořádání.

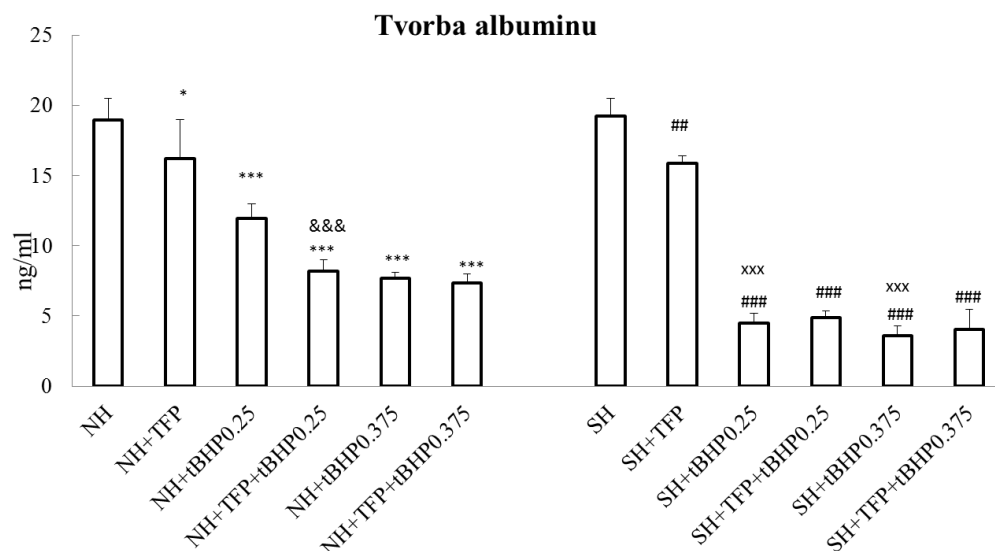
Preinkubace buněk s TFP před expozicí tBHP vedla k redukci úniku LDH do kultivačního média u ztukovatělých hepatocytů (graf 7), ke snížení tvorby ROS u obou skupin (graf 10), ke zvýšení poměru GSH/celkový glutathion u neztukovatělých hepatocytů (graf 12) a ke zvýšení procenta hepatocytů s energizovanými mitochondriemi u obou skupin (graf 13, obr. 23E, F, I, J). Naproti tomu TFP nevykazoval žádný účinek na aktivitu buněčných dehydrogenáz (graf 8), syntézu albuminu (graf 9), ani na tvorbu MDA (graf 11).



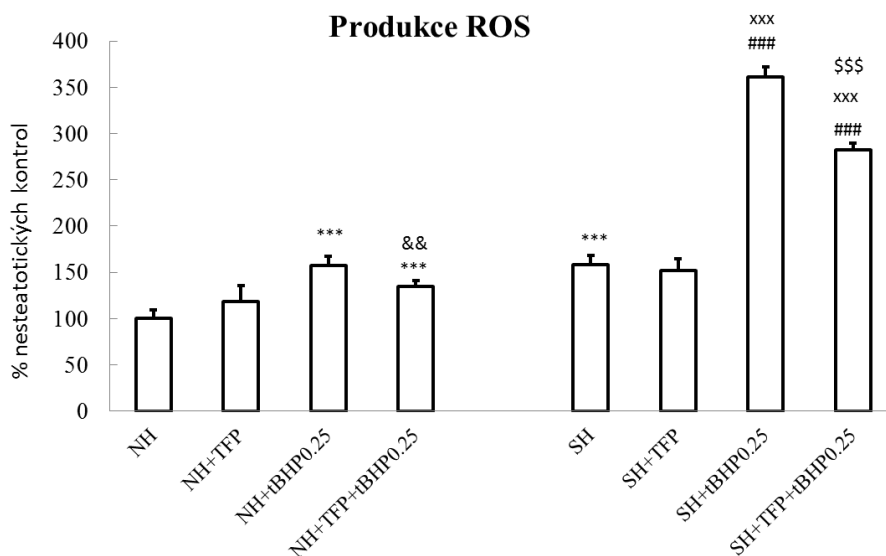
Graf 7 – Aktivita LDH v kultivačním médiu u nesteatotických (NH) a steatotických (SH) hepatocytů preinkubovaných s 5 μ M trifluoperazinem a následně exponovaných tBHP. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. (n=6; *** p<0,001 vs. NH kontroly; ### p<0,001 vs. SH kontroly; xx p<0,01 a xxx p<0,001 vs. odpovídající NH skupina; \$\$\$ p<0,001 vs. SH+tBHP)



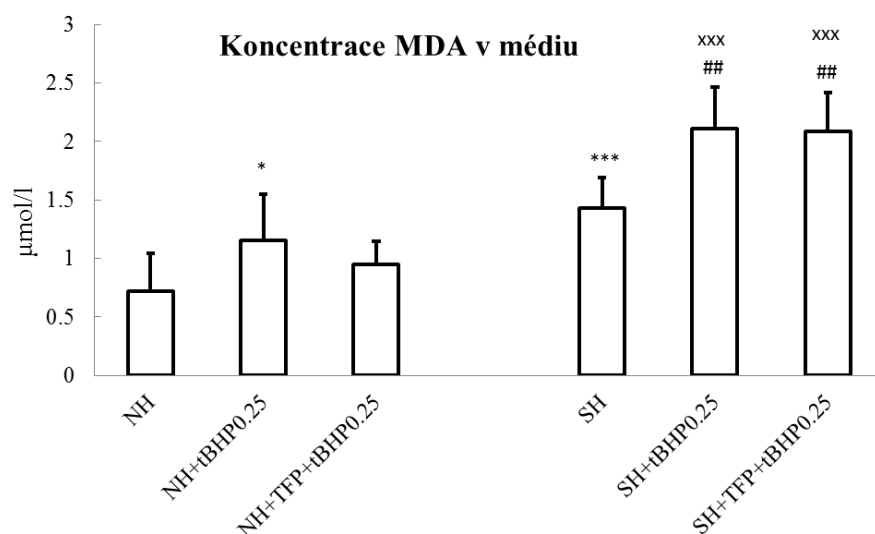
Graf 8 – Aktivita buněčných dehydrogenáz nesteatotických (NH) a steatotických (SH) hepatocytů preinkubovaných s trifluoperazinem a následně exponovaných tBHP. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. (n=6; ### p<0,001 vs. SH kontroly; xx p<0,01 a xxx p<0,001 vs. odpovídající NH skupina)



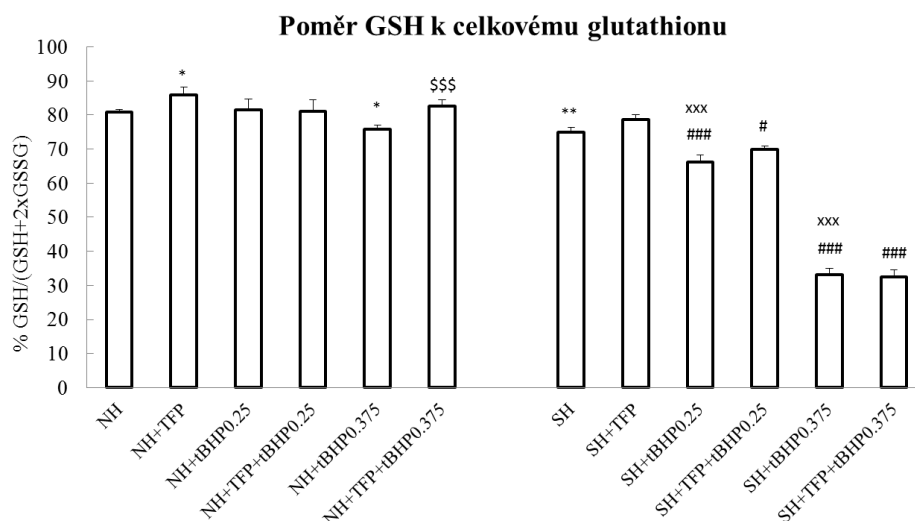
Graf 9 – Produkce albuminu nesteatotickými (NH) a steatotickými (SH) hepatocyty preinkubovanými s trifluoperazinem (TFP) a následně exponovanými tBHP. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. (n=5; * $p<0,05$ a *** $p<0,001$ vs. NH kontroly; &&& $p<0,001$ vs. NH+tBHP0.25; ## $p<0,01$ a ### $p<0,001$ vs. SH kontroly; xxx $p<0,001$ vs. odpovídající NH skupina)



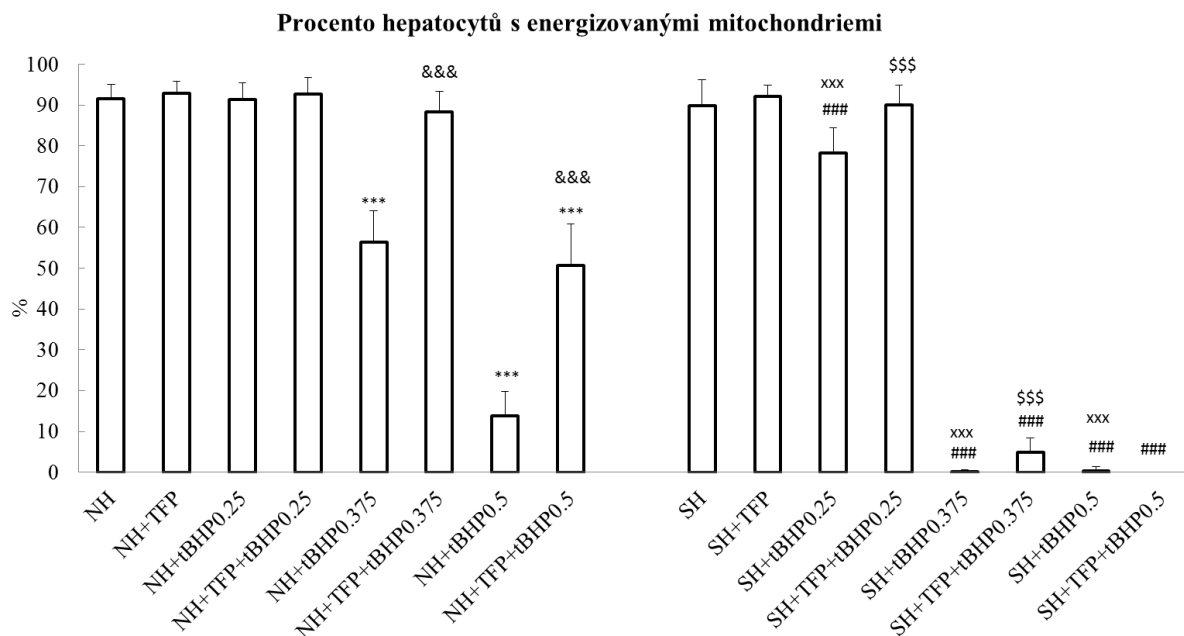
Graf 10 – Produkce ROS nesteatotickými (NH) a steatotickými (SH) hepatocyty preinkubovanými s trifluoperazinem a následně exponovanými tBHP. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. (n=8; *** $p<0,001$ vs. NH kontroly; && $p<0,01$ vs. NH+tBHP; ### $p<0,001$ vs. SH kontroly; xxx $p<0,001$ vs. odpovídající NH skupina; \$\$\$ $p<0,001$ vs. SH+tBHP)



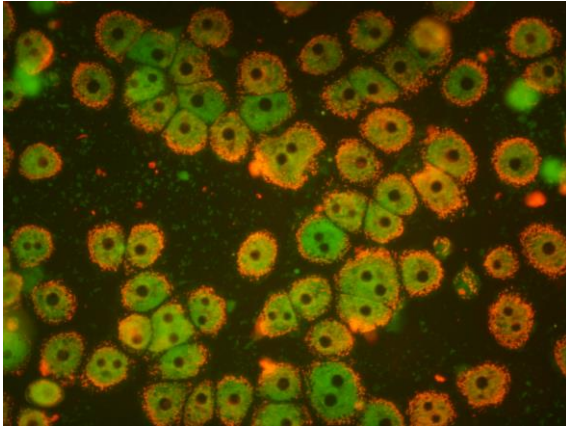
Graf 11 – Produkce MDA nesteatotickými (NH) a steatotickými (SH) hepatocyty preinkubovanými s trifluoperazinem a následně exponovanými tBHP. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. (n=6; * $p < 0,05$ a *** $p < 0,001$ vs. NH kontroly; ## $p < 0,01$ vs. SH kontroly; xxx $p < 0,001$ vs. odpovídající NH skupina)



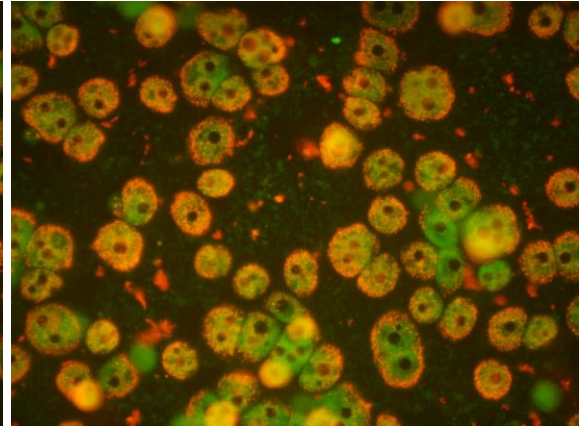
Graf 12 – Nitrobuněčný poměr GSH ku celkový glutathion v nesteatotických (NH) a steatotických (SH) hepatocytech preinkubovaných s trifluoperazinem a následně exponovaných tBHP. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. (n=5; * $p < 0,05$ a ** $p < 0,01$ vs. NH kontroly; &&& $p < 0,001$ vs. NH+tBHP0.375; # $p < 0,01$ a ### $p < 0,001$ vs. SH kontroly; xxx $p < 0,001$ vs. odpovídající NH skupina)



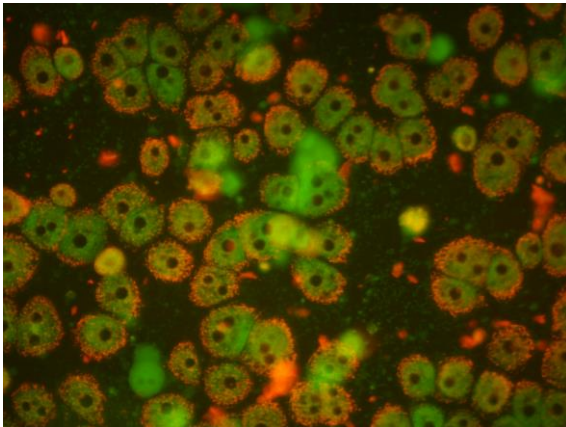
Graf 13 – Procentuální vyjádření počtu nesteatotických (NH) a steatotických (SH) hepatocytů s energizovanými mitochondriemi. Hepatocyty byly nejprve preinkubovány s trifluoperazinem a následně exponovány tBHP. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. (n=16; *** $p < 0,001$ vs. NH kontroly; &&& $p < 0,001$ vs. odpovídající NH+tBHP skupina; ### $p < 0,001$ vs. SH kontroly; xxx $p < 0,001$ vs. odpovídající NH+tBHP skupina; \$\$\$ $p < 0,001$ vs. odpovídající SH+tBHP skupina)



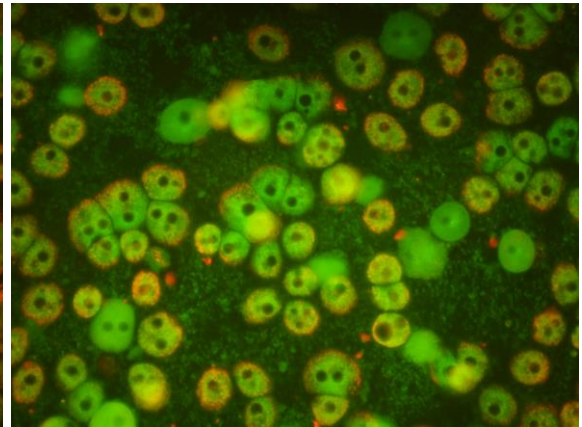
23A



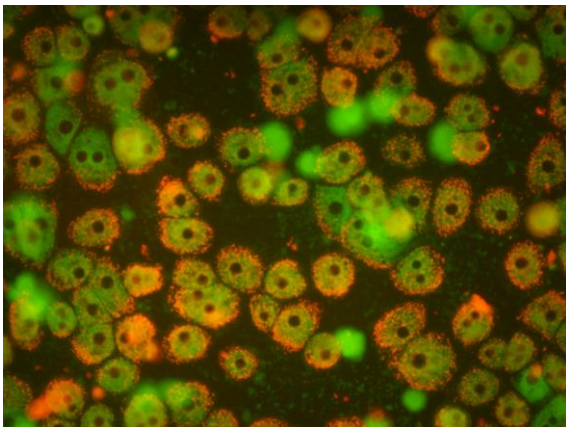
23B



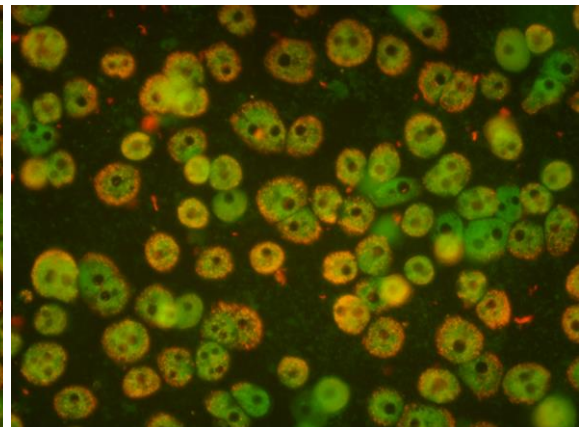
23C



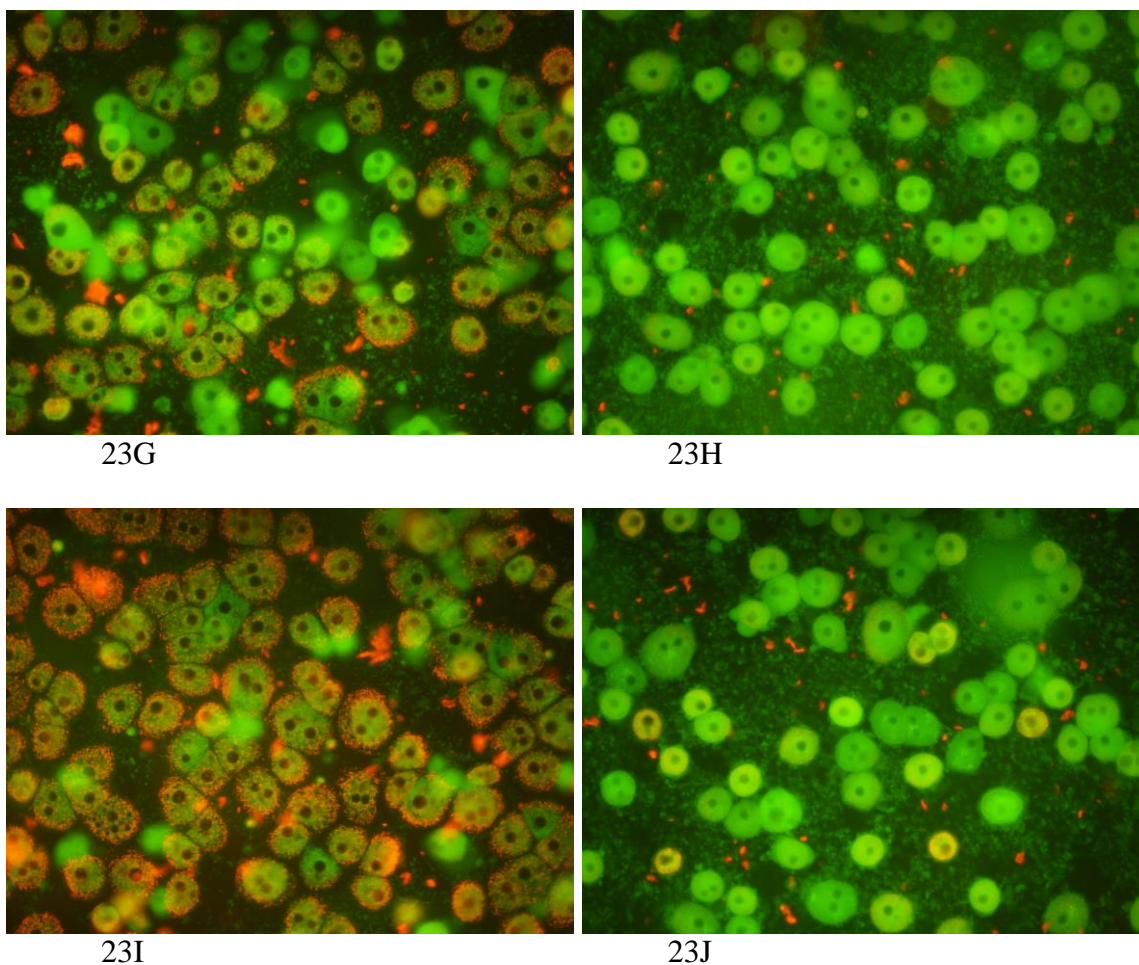
23D



23E



23F



Obrázek 23A - J – Zobrazení mitochondriálního membránového potenciálu u kultivovaných hepatocytů pomocí JC-1. Fluorescenční mikrofotografie nesteatotických (A, C, E, G, I) a steatotických (B, D, F, H, J) hepatocytů inkubovaných bez tBHP (A, B) a s 0,25 mM tBHP (C, D) a 0,375 mM tBHP (G, H) po dobu 30 min., resp. preinkubovaných s 5 μ M TFP po dobu 30 min. a následně inkubovaných s 0,25 mM tBHP (E, F) nebo 0,375 mM tBHP (I, J) pro dobu dalších 30 min. Zvětšení objektivu 40x.

6. DISKUSE

6.1 Zavedení modelu nealkoholové steatózy na potkanech

Stejně jako u jiných patofyziologických stavů je možné pro studium NAFLD využít vhodný zvířecí model. Klíčovou roli při volbě modelu hraje dostupnost modelu a co největší podobnost s NAFLD u lidí.

Při rozhodování o vhodném modelu jsme nejprve uvažovali o MCDD, která však postrádá některé základní charakteristiky. Přestože tento model indukuje rychle a dobře stav podobný NASH (steatóza, zánětlivá infiltrace, elevace transamináz a prozánětlivých cytokinů, navození oxidačního stresu) (Yang *et al.* 2000, Veteläinen *et al.* 2007), je u pokusného zvířete navozen malnutriční stav s váhovým úbytkem bez inzulinorezistence (Kucera and Cervinkova 2014). Také mechanismus vzniku steatohepatitidy je značně vzdálený multifaktoriální etiologii NAFLD u lidí, neboť důvodem pro akumulaci lipidů v játrech s následným rozvojem zánětu je blok sekrece VLDL z jater (Veteläinen *et al.* 2007).

Po vyloučení dalších možností (léky/toxiny navozená steatóza a genetické modely) jsme začali hledat vhodný model mezi nutričními modely. Pro naše účely se zdál být nejvhodnější model využívající krmení vysokotukovou dietou ev. kombinaci vysokotukové diety se zvýšeným příjmem sacharidů (sacharózy či fruktózy). Vysokotuková dieta navozuje u potkanů i myší ztukovatění jater, nicméně progresi prosté steatózy k více pokročilým stavům NAFLD (NASH, fibróza) je relativně vzácná. Jedním z modelů, ve kterých je popisována rychlá progresi do NASH, je model využívající vysokotukovou dietu (71 % energie ve formě lipidů, převážně kukuřičný olej), kdy po 3 týdnech krmení popisuje prof. Lieber indukci stavu podobnému NASH u potkanů kmene Sprague-Dawley (Lieber *et al.* 2004). Vzhledem k detailnímu popisu tohoto modelu jsme se v prvním kroku pokusili tento model reprodukovat v našich podmínkách. Nicméně při použití stejného typu diety se nám nepodařilo po 3 ani po 6 týdnech indukovat steatohepatitidu, pouze prostou steatózu bez známek zánětu, hepatocelulárních nekrosů či fibrotických změn. Nepřítomnost zánětu v jaterní tkáni potvrzuje i velmi malé zvýšení koncentrace proinflamačního cytokinu IL-6 v tkáňovém homogenátu a rovněž pouze nesignifikantní rozdíly v sérových aktivitách ALT a AST mezi skupinami. Naše výsledky dobře korelují s nálezy jiných autorů, kteří u vysokotukových diet obvykle nacházejí pouze známky

malokapénkové, smíšené či velkokapénkové steatózy bez zánětlivých změn (Buettner *et al.* 2006, Romestaing *et al.* 2007).

Dietní model prof. Liebera porovnává účinek vysokotukové stravy a stravy s dietou s 35 % obsahem energie ve formě tuků (Lieber *et al.* 2004). Toto procento energie hrazené z tuků je běžně udávané pro lidi, nicméně u potkanů udává „*American Institute of Nutrition*“ obvyklý obsah energie ve formě tuků pouze 10 % (Reeves *et al.* 1993). Z tohoto důvodu jsme označili tuto kontrolní dietu prof. Liebera jako dietu se středním obsahem tuků MFD. V našich experimentálních podmínkách jsme pozorovali přítomnost malokapénkové steatózy jater u potkanů kmene Wistar krmených MFD po dobu 3 i 6 týdnů, nicméně tento histologický nález nebyl potvrzen u potkanů kmene Sprague-Dawley. Pro ověření steatózy jsme zhodnotili obsah TAG v játrech potkanů krmených MFD, kde jsme zjistili několikanásobně vyšší množství TAG v porovnání oproti kontrolám, a to i u potkanů kmene Sprague-Dawley. Některé práce uvádějí vyšší citlivost potkanů kmene Wistar oproti potkanům kmene Sprague-Dawley k indukci steatózy vysokotukovou dietou (Ahmed *et al.* 2009), což by potvrzoval i náš nález přítomnosti mikrovezikulární steatózy u potkanů kmene Wistar, nikoli však u kmene Sprague-Dawley.

Zajímavým nálezem u potkanů krmených HFD ev. MFD bylo snížení sérových hladin TAG, které naopak bývají zvýšeny u pacientů s NAFLD resp. metabolickým syndromem. Při hledání odpovědi, proč došlo ke snížení hladin TAG, jsme našli odpověď v možné zástavě sekrece VLDL částic z jater. Tyto lipoproteiny jsou hlavním transportním lipoproteinem TAG mimo období po příjmu potravy. Vzorky séra pro stanovení TAG v našich experimentech byly odebrány po 14 hodinách hladovění potkanů. Sekrece VLDL z jater závisí na produkci/dostupnosti apolipoproteinové složky lipoproteinů, tedy apolipoproteinu B-100, a na funkci mikrosomálního triglyceridy přenášejícího proteinu. Oba tyto proteiny, resp. jejich exprese, jsou ovlivňovány inzulinem. Hyperinzulinemie snižuje syntézu apolipoproteinu B-100 v játrech (Cummings *et al.* 1995) a účinek inzulinu rovněž inhibuje jaterní expresi mikrosomálního triglyceridy přenášejícího proteinu (Allister *et al.* 2005), který je nezbytný pro tvorbu VLDL lipoproteinů. Příjem stravy bohaté na tuky vede k rozvoji inzulinové rezistence, zpočátku zejména k periferní inzulinorezistenci (Hegarty *et al.* 2002), což může vést ke zvyšování hladiny inzulinu k zajištění jeho dostatečného účinku. Tyto zvýšené hladiny inzulinu pak mohou po přechodnou dobu měnit sekreci VLDL z jater.

Při sledování spotřeby diet resp. energetického příjmu jsme zjistili, že potkani kmene Sprague-Dawley krmené 3 týdny MFD či HFD resp. 6 týdnů HFD přijali vyšší

množství energie ve srovnání s příslušnou kontrolní skupinou (ST-1). Přes vyšší energetický příjem jsme však nepozorovali rozdíly v konečné váze mezi těmi skupinami. Vyšší energetický příjem může navodit v těle savce adaptační změny vedoucí ke zvýšenému výdeji energie. Jedním z mechanismů vedoucích ke zvýšení energetického výdeje je i zvýšení exprese *uncoupling* proteinů. Tyto proteiny nalézáme ve vnitřní membráně mitochondrií, kde umožňují průchod protonům z mezimembránového prostoru zpět do mitochondriální matrix, čímž rozpřahují mitochondriální oxidaci substrátů a tvorbu ATP. Energie je pak uvolněna ve formě tepla. Strava bohatá na tuky je známá svou schopností indukovat expresi UCP-1 a UCP-3 v hnědé tukové tkáni a kosterní svalovině (Turner *et al.* 2007). Naše výsledky ukazují, že i v játra, přestože za normálních okolností je exprese UCP-2 v játrech nízká, reagují na příjem diety s vyšším obsahem tuků zvýšenou expresí UCP-2. To potvrzuje význam mastných kyselin nejen jako zdroje energie či stavebních prvků pro buňku, ale i pro regulaci genetické exprese (Pegorier *et al.* 2004). Právě PUFA aktivují přes PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor α*) expresi enzymů pro oxidaci mastných kyselin (Buettner *et al.* 2006) více než mononenasycené či plně satureované mastné kyseliny (Duplus *et al.* 2000). Rovněž exprese UCP-2 je v játrech regulována cestou PPAR α .

V patogenezi NAFLD se významně uplatňuje i zvýšený oxidační stres, zejména pak při progresi prosté steatózy do steatohepatitidy. Řada zvířecích modelů prokázala zvýšený oxidační stres v játrech postižených NAFLD (Lieber *et al.* 2004). Obecně pak oxidační stres může být způsobený zvýšenou tvorbou ROS, sníženou antioxidační obranou nebo kombinací obou stavů. Při NAFLD se oxidační stres dává do přímé souvislosti s nárůstem příjmu tuků, což vede ke snížení některých přímo působících antioxidantů i k poklesu aktivit některých antioxidačních enzymových systémů, aktivaci nespecifické imunity (Kupfferovy buňky aj.), nárůst koncentrace proinflamačních cytokinů, mitochondriální dysfunkci apod. (Malaguarnera *et al.* 2009).

V našem modelu jsme sledovali vliv MFD a HFD na obsah GSH v jaterní tkáni a produkci MDA. Zajímavým nálezem byl transientní pokles GSH v průběhu experimentu. Podávání HFD potkanům kmene Wistar resp. MFD a HFD potkanům kmene Sprague-Dawley po dobu 3 týdnů vedlo k signifikantnímu poklesu obsahu jaterního GSH, který však již po 6 týdnech u těchto skupin nebyl patrný. Změny v obsahu GSH mohou být důsledkem metabolické adaptace jater na zvýšený příjem tuků a korespondují se zvýšením exprese UCP-2 v játrech. Funkce UCP-2 přes intenzivní výzkum stále zůstává ne plně objasněná. Jednou z možných funkcí tohoto proteinu může být i ochrana před nadměrným

poškozením oxidačním stresem, kdy UCP-2 snižuje mitochondriální produkci ROS za cenu možného omezení tvorby ATP mitochondriemi (Serviddio *et al.* 2008).

Nárůst lipoperoxidace v játrech je dalším důsledkem probíhajícího oxidačního stresu. Zvýšená lipoperoxidace může vést k přímému poškození hepatocytů nebo k indukci zánětlivé odpovědi (Lee *et al.* 2007) či se podílet na zvýšené fibrogenězi (George *et al.* 2003). Koncentrace MDA v jaterním homogenátu poměrně dobře korespondovala s jaterním obsahem TAG, cholesterolu resp. IL-6. Vzhledem k tomu, že diety s vysokým a středním obsahem tuků obsahovaly vysoký podíl PUFA (kukuřičný olej), můžeme část nárůstu lipoperoxidace přičíst i zvýšené nabídce těchto poměrně snadno oxidovatelných mastných kyselin. Navíc zvýšená oxidace mastných kyselin vede ke zvýšení tvorby ROS. Tato oxidace neprobíhá jen v mitochondriích, ale i v peroxisomech, což dále přispívá ke zvýšení oxidačního stresu a lipoperoxidačního poškození.

Jak již bylo zmíněno v literárním přehledu mitochondriální dysfunkce je považována za jeden z klíčových faktorů etiopatogeneze NAFLD (Vendemiaie *et al.* 2001), které je někdy označováno i jako mitochondriální onemocnění. Mitochondrie jsou pravděpodobně hlavním místem produkce ROS v buňkách, přičemž za hlavní místa tvorby ROS (superoxidový anion) jsou považovány respirační komplexy I a III (Sato 2007). Tvorba ROS v mitochondriích může navozovat či zhoršovat dysfunkci mitochondrií, což může dále vést ke zvyšování tvorby ROS (Feillet-Coudray *et al.* 2009). Navíc oxidační stres může indukovat poškození mitochondriální DNA, která kóduje některé polypeptidové součásti respiračních komplexů I, III, IV, and V. To dále zhoršuje funkci mitochondrií a vede ke zvýšené tvorbě ROS v mitochondriích (Pessayre 2007).

V našem modelu NAFLD jsme našli signifikantní snížení respirace izolovaných mitochondrií ve stavu 3 při použití substrátů komplexu I (glutamát + malát) u potkanů kmene Sprague-Dawley krmených HFD po dobu 3 týdnů. Podobné, leč nesignifikantní, snížení jsme pozorovali i potkanů kmene Wistar krmených HFD po dobu 3 týdnů (resp. i u potkanů obou kmenů krmených MFD po 3 týdny). Po 6 týdnech na experimentálních dietách byly rozdíly daleko menší (Sprague-Dawley) resp. rozdíly jsme nepozorovali vůbec (Wistar). Tento trend respirace komplexu I ve stavu 3 odpovídal změnám v obsahu GSH a lze alespoň z části přisoudit metabolické adaptaci jater na zvýšený přívod tuků a zvýšený oxidační stres. Na rozdíl od respirace izolovaných mitochondrií ve stavu 3 při použití substrátů komplexu I jsme při použití substrátu komplexu II (sukcinát) ve stavu 3 nepozorovali žádné rozdíly mezi skupinami v žádném časovém intervalu. Tento rozdíl v citlivosti komplexu I a komplexu II lze vysvětlit vyšší citlivostí komplexu I

k oxidačnímu stresu (Drahota *et al.* 2005). Snížení aktivity mitochondriálního komplexu I bylo prokázáno i u ob/ob myši (García-Ruiz *et al.* 2006), které jsou rovněž využívány jako jeden z modelů jaterní steatózy.

6.2 Vliv steatózy na jaterní regeneraci po parciální hepatektomii u potkanů

Jedním z rizikových faktorů selhání jater (van den Broek *et al.* 2008) a závažných pooperačních komplikací u pacientů po resekci jater (McCormack *et al.* 2007) je i jaterní steatóza. Rizikovost jaterního ztukovatění pro komplikace po resekci jater byla prokázána i v experimentálních podmínkách (Vetelainen *et al.* 2007b). Přesto však experimentální data týkající se průběhu regenerace jater při steatóze jsou kontroverzní. Zatímco někteří autoři poukazují na zhoršení regenerace při NAFLD (DeAngelis *et al.* 2005, Murata *et al.* 2007), v jiných pracích změny v průběhu regenerace nezaznamenali (Rao *et al.* 2001, Picard *et al.* 2002). Důvodů pro rozdílné nálezy může být hned několik. Jedná se především o různé experimentální modely NAFLD (genetické modely s ob/ob myšmi či Zuckerovi potkani, MCDD, vysokotuková dieta aj.), dále o velikost jaterní steatózy resp. stupeň indukovaného NAFLD (prostá steatóza, steatohepatitida, přítomnost fibrózy, aj.) a rovněž o způsob indukce jaterní regenerace.

Vzhledem k těmto inkonzistentním výsledkům jsme se rozhodli pro “čistý” model jaterní regenerace navozený 2/3 parciální hepatektomií na nutričním vysokotukovém modelu NAFLD, který jsme předtím zavedli. U tohoto modelu se jedná o prostou steatózu bez známek zánětu či fibrózy. Jde tedy o model, který do značné míry odpovídá většině pacientů s NAFLD, kteří podstupují resekci jater. Absence nekroinflamačních změn a fibrózy byla prokázána histologicky, jaterní steatóza pak změřením obsahu TAG ve vzorku jater a rovněž histologickým vyšetřením. Pro přirozený průběh jaterní regenerace je důležitá přechodná akumulace tuků v časně fázi regenerace (Rudnick and Davidson 2012). To potvrzují i naše výsledky u nesteatotických jater (ST-1 dieta), kdy za 24 h po PHx došlo k signifikantnímu nárůstu obsahu tuků v játrech. Přestože u těchto potkanů došlo k indukci přechodné steatózy, u potkanů krmených HFD jsme zvýšenou akumulaci TAG po PHx oproti kontrolním steatotickým potkanům nepozorovali.

Pro zhodnocení vlastní regenerace jater po parciální hepatektomii u potkanů krmených ST-1 a HFD jsme použili imunohistochemické barvení inkorporovaného BrdU

do DNA hepatocytů. U nepoškozených jater je buněčné dělení velmi vzácné a počet hepatocytů s probíhající syntézou DNA je nižší než 0,1 %. Jako zdroj hepatocytů pro tuto běžnou obnovu v nepoškozených játrech slouží již existující populace hepatocytů přiléhající k centrální véně (Wang *et al.* 2015). Absence hepatocytů s inkorporovaným BrdU u kontrolních nesteatotických a ztukovatělých jater v našem experimentu dokládá velmi nízký stupeň obnovy hepatocytů za klidového stavu. Oproti tomu po indukci jaterní regenerace dochází k velmi masivnímu nástupu syntézy DNA, a to již za 18 - 20 h po PHx v periportálních oblastech, jak již v 60. létech bylo zdokumentováno pomocí inkorporace radioaktivně značeného [³H]-thymidinu do DNA (Grisham 1962, Fabrikant 1968). Oproti tomu syntéza DNA v centrilobulárních oblastech je zpožděna asi o 10 hodin. Naše výsledky u ST-1 skupiny 24 h po PHx ukazují vysoký stupeň syntézy DNA a odpovídají dřívějším pracím (Grisham 1962, Fabrikant 1968). Při porovnání počtu hepatocytů s inkorporovaným BrdU (na zorné pole mikroskopu) po PHx mezi ST-1 a HFD jsme neodhalili žádný rozdíl. Nicméně při podrobnějším histologickém zkoumání jsme našli významné zonální uspořádání BrdU-značených hepatocytů s absencí syntézy DNA v centrilobulárních zónách u potkanů krmených HFD. Vzhledem k tomu, že proliferativní odpověď hepatocytů po PHx probíhá od periportální zóny směrem k centrilobulární zóně, můžeme vysvětlit absenci syntézy DNA v centrilobulární zóně opožděním nástupu jaterní regenerace u steatotických jater v porovnání s nesteatotickými játry. Práce Vetelainen a kol. ukazuje na MCDD modelu jaterní steatózy, že mírný stupeň steatózy neovlivňuje jaterní regeneraci po PHx, nicméně došlo ke zhoršení obnovy funkcí a většímu hepatocelulárnímu poškození po resekci jater (Vetelainen *et al.* 2007a).

Úloha cytokinů v regeneraci jater byla diskutována v literárním přehledu. V našem experimentu jsme sledovali 2 cytokiny - IL-6 a TGF-β1. IL-6 je důležitým faktorem ovlivňujícím inicializaci regenerace přes transkripční faktor STAT3 a sérové koncentrace tohoto cytokinu jsou zvýšeny během prvních hodin po PHx a předcházejí o mnoho hodin vlastní syntézu DNA (Streetz *et al.* 2000). Pozorovali jsme trendy zvýšení koncentrace jaterního IL-6 u obou skupin (ST-1 a HFD) po PHx. Je nutno konstatovat, že za 24 h po PHx dochází již ke snižování produkce IL-6 v porovnání s prvními hodinami po indukci regenerace jater. Druhým z cytokinů, jehož koncentrace v jaterním homogenátu jsme sledovali, je TGF-β1. Tento faktor vykazuje antiproliferativní účinky na dělící se hepatocyty po PHx a efekt TGF-β1 je inhibován během časně fáze jaterní regenerace (Russell *et al.* 1988). Trend poklesu hladiny jaterního TGF-β1 za 24 a 48 h po PHx jsme pozorovali u obou skupin (ST-1 i HFD), nicméně za 72 h se jeho koncentrace vrátila na

(nad) kontrolní hodnoty.

Pro průběh jaterní regenerace jsou důležité i změny v redoxním stavu hepatocytů. Huang a kol. zjistili, že zvýšení obsahu GSH v regenerujících játrech je nezbytný pro vstup do S fáze buněčného cyklu (Huang *et al.* 1998). Později další autoři odhalili, že u myši s porušenou syntézou GSH dochází k narušení fáze *primingu*, opoždění syntézy DNA a k apoptóze po PHx (Riehle *et al.* 2013). Změny v obsahu GSH po resekci jater jsme pozorovali rovněž v našem pokusu. PHx vedla ke zvýšení obsahu GSH u nesteatotických i ztukovatělých jater, nicméně u potkanů krmených HFD bylo zvýšení z nižších hodnot. Rovněž poměr GSH/GSSG se signifikantně zvýšil u obou skupin po PHx. Změny v redoxním stavu po PHx (nárůst GSH) doprovází pokles stupně lipoperoxidace, který je daleko patrnější u potkanů krmených HFD. Nižší výchozí hodnoty GSH u kontrolních steatotických potkanů, oproti ST-1 kontrolám, mohou být z části zodpovědné za opoždění nástupu S fáze v centrilobulární zóně jater 24 h po PHx. Přesto si však steatotická játra udržují schopnost zvýšení obsahu GSH i poměru GSH/GSSG po PHx. To může vysvětlovat nepřítomnost rozdílu v celkovém počtu hepatocytů s probíhající syntézou DNA mezi steatotickými a neztukovatělými játry po PHx. Nárůst obsahu GSH a pokles stupně lipoperoxidace po PHx v našem pokusu je v rozporu s některými jinými pracemi (Guerrieri *et al.* 1999). Nicméně obsah GSH resp. koncentrace lipoperoxidačních produktů v játrech po PHx vykazuje časovou kinetiku, kdy nejprve dochází k transientnímu poklesu GSH s následným nárůstem obsahu GSH kolem 12 – 24 h po PHx na hodnoty převyšující výchozí stav (Grattagliano *et al.* 2003, Yang *et al.* 2004).

Jaterní regenerace je provázena i změnami ve funkci mitochondrií. Tyto změny jsou závislé na časovém odstupu od PHx a často vykazují bifázický průběh. Dochází ke změnám ve stavu 3 i stavu 4 respirace a rovněž index respirační kontroly se mění (Svatkova *et al.* 1996, Grattagliano *et al.* 2003, Yang *et al.* 2004). Pravděpodobně díky malému počtu vzorků ve skupině ($n = 3 - 4$) jsme nezjistili signifikantní změny v respiraci izolovaných mitochondrií v žádné z experimentálních skupin. Nicméně konzumpce kyslíku ve stavu 3 při použití substrátů komplexu I vykazovala trend přechodného zvýšení za 24 a 48 h po PHx u obou skupin potkanů (ST-1 i HFD). Tento trend zvýšení respirace ve stavu 3 jsme však nepozorovali při použití substrátů komplexu II, což koresponduje s dřívějšími nálezy Yanga a kol. (Yang *et al.* 2004). Rovněž jsme zaznamenali trend přechodného zvýšení RCI při použití sukcinátu (substrát komplexu II) 24 h po PHx u potkanů krmených ST-1 i HFD. To je rovněž v souladu s výše zmiňovanou prací (Yang *et al.* 2004).

6.3 Vliv oxidačního stresu indukovaného terciárním-butylhydroperoxidem na steatotické hepatocyty potkana v podmínkách *in vitro*

Posledním cílem této disertační práce bylo zjistit, zda steatotické hepatocyty izolované ze ztukovatělých jater vykazují změněnou citlivost vůči indukovanému oxidačnímu stresu v podmínkách *in vitro*. Pro navození zvýšeného peroxidativního poškození izolovaných hepatocytů jsme použili prooxidační látku terciární butylhydroperoxid, který je široce užíván pro sledování mechanismů podílejících se na oxidačním resp. lipoperoxidačním poškození. Oxidační stres je považován za jeden z hlavních faktorů při rozvoji a progresi NAFLD (Serviddio *et al.* 2013).

Naše předchozí výsledky při zavádění modelu NAFLD na potkanech a výsledky jiných experimentálních i klinických studií (Videla *et al.* 2004) ukazují narušení redoxní rovnováhy v játrech postižených NAFLD, což dokumentuje snížený obsah GSH resp. sníženým poměrem GSH ku GSSG nebo celkovému glutathionu. Rovněž práce používající steatotické hepatocyty v *in vitro* podmínkách (Anavi *et al.* 2012, Kučera *et al.* 2012) dokumentují narušení redoxní rovnováhy a pokles obsahu GSH. V rozporu s těmito nálezy některé práce *in vivo* (Grattagliano *et al.* 2008) a *in vitro* (Garcia *et al.* 2011) dokumentují nárůst obsahu GSH při indukci steatózy. Tento zdánlivý rozpor však může vysvětlit právě práce Grattagliana a kol. (Grattagliano *et al.* 2008), ve které na modelu steatózy u potkana jasně ukazují transientní časný nárůst obsahu GSH následovaný progresivním snížením tohoto buněčného antioxidantu. Přechodné zvýšení GSH může být jedním z adaptačních mechanismů antioxidační odpovědi na zvýšení přísunu lipidů.

tBHP je v buňce z části metabolizován glutathionperoxidázou (Crane *et al.* 1983), což vede k depleci intracelulárního obsahu GSH. Proto snížený obsah GSH ve steatotických hepatocytech, který jsme v *in vitro* modelu popsali, predisponuje tyto hepatocyty ke zvýšené náchylnosti k oxidačnímu poškození. Snížený poměr GSH/celkový glutathion v kontrolních steatotických hepatocytech dobře koreluje s nálezem zvýšené produkce ROS a zvýšené tvorby MDA v těchto buňkách. tBHP navozuje na dávce a čase závislou produkci ROS v nesteatotických i ztukovatělých hepatocytech, nicméně produkce ROS je významně vyšší ve steatotických buňkách. Zvýšená citlivost ztukovatělých hepatocytů k oxidačnímu poškození indukovanému tBHP dokumentuje i časnější poškození plazmatické membrány oproti nesteatotickým hepatocytům, kdy již 15 min. inkubace s 0,25 mM tBHP vedla k signifikantnímu zvýšení aktivity LDH v kultivačním

médiu, zatímco u nesteatotických buněk nedošlo k nárůstu aktivity ani po 60 min. Jednou z možných příčin tohoto jevu může být i horší integrita plazmatické membrány u steatotických hepatocytů, což je dokumentováno vyšší aktivitou LDH v médiu u kontrolních steatotických ve srovnání s neztukovatělymi buňkami. Proteosyntetická funkce steatotických hepatocytů ovlivněných tBHP je rovněž nižší, což dokazuje redukce produkce albuminu na 23 % kontrolních hodnot oproti 63 % u neztukovatělých hepatocytů po 30 min. expozici 0,25 mM tBHP. Změna redoxního stavu a S-thiolace buněčných proteinů může být zodpovědná za inhibici proteosyntézy za podmínek oxidačního stresu (Latour *et al.* 1999).

Oxidační stres může být jednou z příčin mitochondriální dysfunkce u NAFLD a mitochondriální dysfunkce pak dále může zvyšovat tvorbu ROS. ROS mohou indukovat fenomén *mitochondrial permeability transition* (MPT) (Halestrap *et al.* 2002). Stejně tak je i tBHP známým induktorem MPT v izolovaných hepatocytech (Imberti *et al.* 1993). Přímé měření MPT v izolovaných buňkách je z řady důvodů velmi obtížné. Proto jsme v našem experimentu použili fluorescenční zobrazení mitochondriálního membránového potenciálu, za jehož změny může být MPT zodpovědný. Mimo to jsme hepatocyty inkubovali i s inhibitory MPT. Jelikož cyklosporin A vykazoval velmi slabý ochranný účinek před tBHP-navozeným MPT, přešli jsme k silnějšímu inhibitoru MPT trifluoperazinu. Ten již byl schopný částečně předcházet poklesu MMP v hepatocytech exponovaných tBHP. Mimo vliv na MMP jsme prokázali ochranný účinek TFP na poškození plazmatické membrány u steatotických hepatocytů, tvorbu ROS u steatotických i neztukovatělých buněk a obsah GSH v nesteatotických hepatocytech vystavených tBHP. Přes tyto pozitivní účinky jsme u TFP nezaznamenali vliv na aktivitu buněčných dehydrogenáz a dokonce jsme zjistili pokles produkce albuminu a zvýšenou lipoperoxidaci.

Lipoperoxidace v játrech postižených NAFLD bývá často zvýšená, a to díky vyšší nabídce mastných kyselin a snížené antioxidační kapacitě těchto jater (Videla *et al.* 2004). V *in vitro* podmínkách jsme rovněž prokázali cca dvojnásobný obsah MDA v kontrolních steatotických buňkách oproti neztukovatělým kontrolám. Další zvýšení oxidačního stresu tBHP pak vedlo k vyššímu nárůstu tvorby MDA ve steatotických hepatocytech. Produkty lipoperoxidace (Rashba-Step *et al.* 1997) spolu s ROS (Madesh and Balasubramanian 1997) patří k aktivátorům fosfolipázy A2. Aktivace tohoto enzymu pak může v důsledku vést k navození MPT (Gadd *et al.* 2006). TFP rovněž inhibuje fosfolipázu A2, čímž lze vysvětlit jeho vyšší účinnost v prevenci tBHP-indukovaného poškození oproti cyklosporinu A.

Jak již bylo opakovaně zmíněno, mitochondriální dysfunkce je považována za jeden z hlavních mechanismů patogeneze a progresu NAFLD (Pessayre 2007). V našem pokusu *in vitro* jsme sledovali respiraci digitoninem permeabilizovaných hepatocytů. Zjistili jsme, že u kontrolních ztukovatělých buněk při použití substrátů komplexu I dochází k signifikantnímu snížení spotřeby kyslíku ve stavu 3 a k nesignifikantnímu trendu snížení RCI. Zdá se, že komplex I nedokáže plně saturovat respirační řetězec, neboť po přidání substrátu komplexu II k substrátům komplexu I dále zvýšilo konzumpci kyslíku u všech experimentálních skupin. Substráty komplexů I a II dohromady pak plně kompenzovaly respiraci dýchacího řetězce při snížené aktivitě komplexu I u ztukovatělých hepatocytů. To by mohlo ukazovat na to, že komplex II nebyl v našem pokusu inhibován. Tuto domněnku podporují i výsledky Cardoso a kol., kteří popsali dokonce trend zvýšené respirace ve stavu 3 a RCI při použití sukcinátu v mitochondriích izolovaných z jater myší krmených vysokotukovou dietou (Cardoso *et al.* 2013). Naopak jiná práce popisuje pokles sukcinát-dependentní respirace ve stavu 3 (Mantena *et al.* 2009) v mitochondriích izolovaných z potkanů krmených vysokotukovou dietou.

Komplex I je ve steatotických hepatocytech ještě více citlivý vůči účinku tBHP ve srovnání s neztukovatělými buňkami. Snížená aktivita komplexu I pak zhoršuje mitochondriální funkci a může vést ke snížení produkce ATP a zvýšení tvorby ROS (Kushnareva *et al.* 2002). Expozice tBHP v našem experimentu vedla k nesignifikantnímu zvýšení respirace za přítomnosti substrátů komplexu I ve stavu 4 u nesteatotických i ztukovatělých hepatocytů. Vyšší spotřeba kyslíku ve stavu 4 pak může být způsobena poškozením vnitřní mitochondriální membrány a její zvýšenou permeabilitou pro protony (Rolfe *et al.* 1994). Pokles respirace ve stavu 3 a zvýšení spotřeby kyslíku ve stavu 4 pak vedou k redukci RCI po expozici tBHP u obou experimentálních skupin. Navíc oxidační stres indukovaný velmi malou dávkou tBHP vede k velmi významné inhibici oxidace palmitoyl karnitunu (Endlicher *et al.* 2009) a tak i mírný oxidační stres může vést k redukci oxidace mastných kyselin v mitochondriích a progresi jaterní steatózy. Při použití tBHP však již nedošlo k plné kompenzaci snížené respirace ve stavu 3 přidáním sukcinátu. Kombinace vysokotukové diety a induktoru oxidačního stresu může synergickým účinkem vést ke snížení aktivity i komplexu II.

7. ZÁVĚRY

1. Použitím vysokotukové diety po dobu 3 a 6 týdnů se nám podařilo navodit nealkoholové ztukovatění jater u potkanů kmenů Wistar a Sprague-Dawley. U obou kmenů potkanů se jedná o prostou steatózu bez známek zánětu, nekrózy či fibrotických změn. Tento nutriční model nenavodil stav podobný lidské NASH, což je obvyklé u většiny modelů u potkanů založených na podávání vysokotukové diety. Tato zdánlivá nevýhoda však pravděpodobně odpovídá více situaci u lidí než spontánní progresi prosté steatózy do NASH u všech pokusných zvířat, neboť i u lidí progreduje do NASH pouze menší část pacientů se steatózou jater (Younossi *et al.* 2016).
2. Regenerace jater postižených prostou steatózou navozená 2/3 parciální hepatektomií není signifikantně ovlivněna v porovnání s neztukovatělými játry. Jedinou změnou v regenerační odpovědi, kterou jsme pozorovali u steatotických jater, je možné zpoždění nástupu proliferace v centrilobulárních zónách jaterního acinu.
3. Neovlivněné steatotické hepatocyty v podmínkách *in vitro* v porovnání s neztukovatělými kontrolami vykazují vyšší produkci reaktivních forem kyslíku, vyšší stupeň lipoperoxidace, nižší redoxní stav glutathionu a sníženou respiraci ve stavu 3 při použití substrátů komplexu I. Steatotické hepatocyty jsou zvýšeně citlivé k oxidačnímu poškození navozenému terciárním butylhydroperoxidem, což podporuje široce uznávanou hypotézu, že steatóza zvyšuje náchylnost hepatocytů k dalším inzultům.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABSHAGEN K, EIPEL C, VOLLMAR B: A critical appraisal of the hemodynamic signal driving liver regeneration. *Langenbecks Arch Surg* **397**: 579-590, 2012.
- AHMED U, REDGRAVE TG, OATES PS: Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat. *J Gastroenterol Hepatol* **24**: 1463-1471, 2009.
- AKAZAWA Y, NAKAO K: Lipotoxicity pathways intersect in hepatocytes: endoplasmic reticulum stress, c-Jun N-terminal kinase-1, and death receptors. *Hepatol Res*: 2016.
- ALBERTI KG, ECKEL RH, GRUNDY SM, ZIMMET PZ, CLEEMAN JI, DONATO KA, FRUCHART JC, JAMES WP, LORIA CM, SMITH SC, JR.: Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120**: 1640-1645, 2009.
- ALLISTER EM, BORRADAILE NM, EDWARDS JY, HUFF MW: Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein expression and apolipoprotein B100 secretion by the citrus flavonoid naringenin and by insulin involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in hepatocytes. *Diabetes* **54**: 1676-1683, 2005.
- ALWAYN IPJ, VERBESEY JE, KIM S, ROY R, ARSENAULT DA, GREENE AK, NOVAK K, LAFORME A, LEE S, MOSES MA, PUDER M: A Critical Role for Matrix Metalloproteinases in Liver Regeneration. *Journal of Surgical Research* **145**: 192-198, 2008.
- ANAVI S, HARMELIN NB, MADAR Z, TIROSH O: Oxidative stress impairs HIF1alpha activation: a novel mechanism for increased vulnerability of steatotic hepatocytes to hypoxic stress. *Free Radic Biol Med* **52**: 1531-1542, 2012.
- ASSY N, GONG Y, ZHANG M, PETTIGREW NM, PASHNIAK D, MINUK GY: Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Lab Clin Med* **131**: 251-256, 1998.
- ASSY N, MINUK GY: Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol* **26**: 945-952, 1997.
- AVNI Y, SHIRIN H, AEED H, SHAHMUROV M, BIRKENFELD S, BRUCK R: Thioacetamide-induced hepatic damage in a rat nutritional model of steatohepatitis. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **30**: 141-147, 2004.
- BAUMGARDNER JN, SHANKAR K, HENNINGS L, BADGER TM, RONIS MJ: A new model for nonalcoholic steatohepatitis in the rat utilizing total enteral nutrition to overfeed a high-polyunsaturated fat diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**: G27-38, 2008.

- BAX HR, MANSENS BJ, SCHALM L: Atrophy of the liver after occlusion of the bile ducts or portal vein and compensatory hypertrophy of the unoccluded portion and its clinical importance. *Gastroenterology* **31**: 131-155, 1956.
- BEHRNS KE, TSIOTOS GG, DESOUZA NF, KRISHNA MK, LUDWIG J, NAGORNEY DM: Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg* **2**: 292-298, 1998.
- BELLENTANI S, SCAGLIONI F, MARINO M, BEDOGNI G: Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* **28**: 155-161, 2010.
- BERRY MN (1991) Chapter 2 High-yield preparation of isolated hepatocytes from rat liver. In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (Burdon RH, Knippenberg PHv, eds), vol Volume 21, pp 15-58: Elsevier.
- BISSELL DM, WANG SS, JARNAGIN WR, ROLL FJ: Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* **96**: 447-455, 1995.
- BLIGH EG, DYER WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* **37**: 911-917, 1959.
- BORST SE: The role of TNF-alpha in insulin resistance. *Endocrine* **23**: 177-182, 2004.
- BRADFORD MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254, 1976.
- BROWN GT, KLEINER DE: Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism* **65**: 1080-1086, 2016.
- BRUNT EM, JANNEY CG, DI BISCEGLIE AM, NEUSCHWANDER-TETRI BA, BACON BR: Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American journal of gastroenterology* **94**: 2467-2474, 1999.
- BRUNT EM, KLEINER DE, WILSON LA, BELT P, NEUSCHWANDER-TETRI BA: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* **53**: 810-820, 2011.
- BUETTNER R, PARHOFER KG, WOENCKHAUS M, WREDE CE, KUNZ-SCHUGHART LA, SCHOLMERICH J, BOLLHEIMER LC: Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* **36**: 485-501, 2006.
- BUCHER NL: Liver regeneration: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* **6**: 615-624, 1991.
- BUCHER NL, SWAFFIELD MN: The rate of incorporation of labelled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised. *Cancer Res* **24**: 1611-1625, 1964.
- BULLWINKEL J, BARON-LUHR B, LUDEMANN A, WOHLLENBERG C, GERDES J, SCHOLZEN T: Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* **206**: 624-635, 2006.
- BUNCHORNTAVAKUL C, REDDY KR: Acetaminophen-related hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* **17**: 587-607, viii, 2013.

- BURTON K (1968) [105] Determination of DNA concentration with diphenylamine. In: Methods in Enzymology, vol Volume 12, Part B, pp 163-166: Academic Press.
- BUSTAMANTE E, SOPER JW, PEDERSEN PL: A high-yield preparative method for isolation of rat liver mitochondria. *Analytical biochemistry* **80**: 401-408, 1977.
- CARDOSO AR, KAKIMOTO PA, KOWALTOWSKI AJ: Diet-sensitive sources of reactive oxygen species in liver mitochondria: role of very long chain acyl-CoA dehydrogenases. *PLoS One* **8**: e77088, 2013.
- CERVINKOVA Z, LOTKOVA H, KRIVAKOVA P, ROUSAR T, KUCERA O, TICHY L, CERVINKA M, DRAHOTA Z: Evaluation of mitochondrial function in isolated rat hepatocytes and mitochondria during oxidative stress. *Altern Lab Anim* **35**: 353-361, 2007.
- CORTEZ-PINTO H, CHATHAM J, CHACKO VP, ARNOLD C, RASHID A, DIEHL AM: Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *JAMA* **282**: 1659-1664, 1999.
- CRANE D, HAUSSINGER D, GRAF P, SIES H: Decreased flux through pyruvate dehydrogenase by thiol oxidation during t-butyl hydroperoxide metabolism in perfused rat liver. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **364**: 977-987, 1983.
- CRESSMAN DE, GREENBAUM LE, DEANGELIS RA, CILIBERTO G, FURTH EE, POLI V, TAUB R: Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* **274**: 1379-1383, 1996.
- CUMMINGS MH, WATTS GF, UMPLEBY AM, HENNESSY TR, KELLY JM, JACKSON NC, SONKSEN PH: Acute hyperinsulinemia decreases the hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in NIDDM. *Diabetes* **44**: 1059-1065, 1995.
- CURRIER AR, SABLA G, LOCAPUTO S, MELIN-ALDANA H, DEGEN JL, BEZERRA JA: Plasminogen directs the pleiotropic effects of uPA in liver injury and repair. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**: G508-515, 2003.
- DAY CP: From fat to inflammation. *Gastroenterology* **130**: 207-210, 2006.
- DAY CP, JAMES OF: Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* **114**: 842-845, 1998.
- DE MEIJER VE, KALISH BT, PUDER M, IJZERMANS JN: Systematic review and meta-analysis of steatosis as a risk factor in major hepatic resection. *Br J Surg* **97**: 1331-1339, 2010.
- DE MINICIS S, KISSELEVA T, FRANCIS H, BARONI GS, BENEDETTI A, BRENNER D, ALVARO D, ALPINI G, MARZIONI M: Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. *Dig Liver Dis* **45**: 450-459, 2013.
- DEANGELIS RA, MARKIEWSKI MM, TAUB R, LAMBRIS JD: A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, IkappaBalpha. *Hepatology* **42**: 1148-1157, 2005.
- DECKER K, KEPPLER D: Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*: 77-106, 1974.
- DIEHL AM: Lessons from animal models of NASH. *Hepatol Res* **33**: 138-144, 2005.

- DRAHOTA Z, KRIVÁKOVÁ P, CERVINKOVÁ Z, KMONÍCKOVÁ E, LOTKOVÁ H, KUCERA O, HOUSTEK J: Tert-butyl hydroperoxide selectively inhibits mitochondrial respiratory-chain enzymes in isolated rat hepatocytes. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **54**: 67-72, 2005.
- DUAN XY, ZHAO HP, FAN JG: Dynamic expression of hepatic thioredoxin mRNA in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *J Dig Dis* **11**: 94-100, 2010.
- DUPLUS E, GLORIAN M, FOREST C: Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem* **275**: 30749-30752, 2000.
- DVORAK K, HAINER R, PETRTYL J, ZEMAN M, VAREKA T, ZAK A, SROUBKOVA R, SVESTKA T, VITEK L, BRUHA R: The prevalence of nonalcoholic liver steatosis in patients with type 2 diabetes mellitus in the Czech Republic. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*: 2014.
- ENDLICHER R, KRIVAKOVA P, RAUCHOVA H, NUSKOVA H, CERVINKOVA Z, DRAHOTA Z: Peroxidative damage of mitochondrial respiration is substrate-dependent. *Physiol Res* **58**: 685-692, 2009.
- ENDO M, MASAKI T, SEIKE M, YOSHIMATSU H: TNF-alpha induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). *Exp Biol Med (Maywood)* **232**: 614-621, 2007.
- EVARTS RP, HU Z, FUJIO K, MARSDEN ER, THORGEIRSSON SS: Activation of hepatic stem cell compartment in the rat: role of transforming growth factor alpha, hepatocyte growth factor, and acidic fibroblast growth factor in early proliferation. *Cell Growth Differ* **4**: 555-561, 1993.
- FABRIKANT JI: The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J Cell Biol* **36**: 551-565, 1968.
- FARRELL GC, LARTER CZ: Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* **43**: S99-S112, 2006.
- FAUSTO N: Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transpl* **7**: 835-844, 2001.
- FAUSTO N, CAMPBELL JS: The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* **120**: 117-130, 2003.
- FAUSTO N, CAMPBELL JS, RIEHLE KJ: Liver regeneration. *Hepatology* **43**: S45-53, 2006.
- FAUSTO N, RIEHLE KJ: Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **12**: 181-189, 2005.
- FEILLET-COUDRAY C, SUTRA T, FOURET G, RAMOS J, WRUTNIAK-CABELLO C, CABELLO G, CRISTOL JP, COUDRAY C: Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radic Biol Med* **46**: 624-632, 2009.
- FITZHUGH OG, NELSON AA: Liver Tumors in Rats Fed Thiourea or Thioacetamide. *Science* **108**: 626-628, 1948.
- GADD ME, BROEKEMEIER KM, CROUSER ED, KUMAR J, GRAFF G, PFEIFFER DR: Mitochondrial iPLA2 activity modulates the release of cytochrome c from mitochondria and influences the permeability transition. *J Biol Chem* **281**: 6931-6939, 2006.

- GAMBINO R, MUSSO G, CASSADER M: Redox balance in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* **15**: 1325-1365, 2011.
- GAO B: Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol Immunol* **2**: 92-100, 2005.
- GAO D, NONG S, HUANG X, LU Y, ZHAO H, LIN Y, MAN Y, WANG S, YANG J, LI J: The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. *J Biol Chem* **285**: 29965-29973, 2010.
- GAO D, WEI C, CHEN L, HUANG J, YANG S, DIEHL AM: Oxidative DNA damage and DNA repair enzyme expression are inversely related in murine models of fatty liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**: G1070-1077, 2004.
- GARCÍA-RUIZ I, RODRÍGUEZ-JUAN C, DÍAZ-SANJUAN T, DEL HOYO P, COLINA F, MUÑOZ-YAGÜE T, SOLÍS-HERRUZO JA: Uric acid and anti-TNF antibody improve mitochondrial dysfunction in ob/ob mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **44**: 581-591, 2006.
- GARCIA MC, AMANKWA-SAKYI M, FLYNN TJ: Cellular glutathione in fatty liver in vitro models. *Toxicol In Vitro* **25**: 1501-1506, 2011.
- GEORGE J, PERA N, PHUNG N, LECLERCQ I, YUN HOU J, FARRELL G: Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *Journal of hepatology* **39**: 756-764, 2003.
- GRATTAGLIANO I, CARACENI P, CALAMITA G, FERRI D, GARGANO I, PALASCIANO G, PORTINCASA P: Severe liver steatosis correlates with nitrosative and oxidative stress in rats. *Eur J Clin Invest* **38**: 523-530, 2008.
- GRATTAGLIANO I, LAUTERBURG BH, PORTINCASA P, CARUSO ML, VENDEMIALE G, VALENTINI AM, PALMIERI VO, PALASCIANO G: Mitochondrial glutathione content determines the rate of liver regeneration after partial hepatectomy in eu- and hypothyroid rats. *J Hepatol* **39**: 571-579, 2003.
- GRISHAM JW: A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res* **22**: 842-849, 1962.
- GUERRIERI F, VENDEMIALE G, GRATTAGLIANO I, COCCO T, PELLECCIA G, ALTOMARE E: Mitochondrial oxidative alterations following partial hepatectomy. *Free Radic Biol Med* **26**: 34-41, 1999.
- HALESTRAP AP, MCSTAY GP, CLARKE SJ: The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* **84**: 153-166, 2002.
- HARDWICK RN, FISHER CD, CANET MJ, LAKE AD, CHERRINGTON NJ: Diversity in antioxidant response enzymes in progressive stages of human nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos* **38**: 2293-2301, 2010.
- HATA S, NAMAIE M, NISHINA H: Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy. *Dev Growth Differ* **49**: 163-170, 2007.
- HÄUSSINGER D (2011) Liver Regeneration: De Gruyter.
- HEGARTY BD, COONEY GJ, KRAEGEN EW, FURLER SM: Increased efficiency of fatty acid uptake contributes to lipid accumulation in skeletal muscle of high fat-fed insulin-resistant rats. *Diabetes* **51**: 1477-1484, 2002.

- HIGGINS G, ANDERSON R: Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Archives of pathology (Chic)* **12**: 186 - 202, 1931.
- HIROSUMI J, TUNCMAN G, CHANG L, GORGUN CZ, UYSAL KT, MAEDA K, KARIN M, HOTAMISLIGIL GS: A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**: 333-336, 2002.
- HISSIN PJ, HILF R: A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry* **74**: 214-226, 1976.
- HOLSTEGE A, ANUKARAHANONTA T, YAMAMOTO M, KOCH HK, KATTERMANN R, LESCH R, KEPPLER D: Preventive effects of 5-fluorouridine and uridine on d-galactosamine-induced liver injury. *Exp Mol Pathol* **34**: 170-182, 1981.
- HORTELANO S, ZEINI M, CASADO M, MARTIN-SANZ P, BOSCA L: Animal models for the study of liver regeneration: role of nitric oxide and prostaglandins. *Front Biosci* **12**: 13-21, 2007.
- HUANG ZZ, LI H, CAI J, KUHNENKAMP J, KAPLOWITZ N, LU SC: Changes in glutathione homeostasis during liver regeneration in the rat. *Hepatology* **27**: 147-153, 1998.
- CHALASANI N, YOUNOSSI Z, LAVINE JE, DIEHL AM, BRUNT EM, CUSI K, CHARLTON M, SANYAL AJ: The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* **55**: 2005-2023, 2012.
- CHALDAKOV GN, STANKULOV IS, HRISTOVA M, GHENEV PI: Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology. *Curr Pharm Des* **9**: 1023-1031, 2003.
- CHARI RS, PRICE DT, SUE SR, MEYERS WC, JIRTLE RL: Down-regulation of transforming growth factor beta receptor type I, II, and III during liver regeneration. *Am J Surg* **169**: 126-131; discussion 131-122, 1995.
- CHAVEZ-TAPIA NC, ROSSO N, URIBE M, BOJALIL R, TIRIBELLI C: Kinetics of the inflammatory response induced by free fatty acid accumulation in hepatocytes. *Ann Hepatol* **13**: 113-120, 2013.
- CHILAKAPATI J, SHANKAR K, KORRAPATI MC, HILL RA, MEHENDALE HM: Saturation toxicokinetics of thioacetamide: role in initiation of liver injury. *Drug Metab Dispos* **33**: 1877-1885, 2005.
- CHO JY, SUH KS, KWON CH, YI NJ, LEE KU: Mild hepatic steatosis is not a major risk factor for hepatectomy and regenerative power is not impaired. *Surgery* **139**: 508-515, 2006.
- CHUNG H, KIM HJ, JANG KS, KIM M, YANG J, KANG KS, KIM HL, YOON BI, LEE MO, LEE BH, KIM JH, LEE YS, KONG G: Comprehensive analysis of differential gene expression profiles on D-galactosamine-induced acute mouse liver injury and regeneration. *Toxicology* **227**: 136-144, 2006.

- IBRAHIM S, CHEN CL, WANG CC, WANG SH, LIN CC, LIU YW, YANG CH, YONG CC, CONCEJERO A, CHENG YF: Liver regeneration and splenic enlargement in donors after living-donor liver transplantation. *World J Surg* **29**: 1658-1666, 2005.
- IMBERTI R, NIEMINEN AL, HERMAN B, LEMASTERS JJ: Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. *J Pharmacol Exp Ther* **265**: 392-400, 1993.
- JAESCHKE H, WILLIAMS CD, MCGILL MR, XIE Y, RAMACHANDRAN A: Models of drug-induced liver injury for evaluation of phytotherapeutics and other natural products. *Food and Chemical Toxicology* **55**: 279-289, 2013.
- JAESCHKE H, WILLIAMS CD, RAMACHANDRAN A, BAJT ML: Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver Int* **32**: 8-20, 2012.
- JAKOWLEW SB, MEAD JE, DANIELPOUR D, WU J, ROBERTS AB, FAUSTO N: Transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in rat liver regeneration: messenger RNA expression and activation of latent TGF-beta. *Cell Regul* **2**: 535-548, 1991.
- JIA C: Advances in the regulation of liver regeneration. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **5**: 105-121, 2011.
- JU C, REILLY TP, BOURDI M, RADONOVICH MF, BRADY JN, GEORGE JW, POHL LR: Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice. *Chem Res Toxicol* **15**: 1504-1513, 2002.
- KASRAVI FB, WANG L, WANG XD, MOLIN G, BENGMARK S, JEPSSON B: Bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine. *Hepatology* **23**: 97-103, 1996.
- KAWAHARA H, FUKURA M, TSUCHISHIMA M, TAKASE S: Mutation of mitochondrial DNA in livers from patients with alcoholic hepatitis and nonalcoholic steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* **31**: S54-60, 2007.
- KAWASAKI T, IGARASHI K, KOEDA T, SUGIMOTO K, NAKAGAWA K, HAYASHI S, YAMAJI R, INUI H, FUKUSATO T, YAMANOUCHI T: Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *The Journal of nutrition* **139**: 2067-2071, 2009.
- KELE PG, VAN DER JAGT EJ, GOUW AS, LISMAN T, PORTE RJ, DE BOER MT: The impact of hepatic steatosis on liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver Int* **33**: 469-475, 2013.
- KIM TH, MARS WM, STOLZ DB, PETERSEN BE, MICHALOPOULOS GK: Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* **26**: 896-904, 1997.
- KLEINER DE, BRUNT EM, VAN NATTA M, BEHLING C, CONTOS MJ, CUMMINGS OW, FERRELL LD, LIU Y-C, TORBENSON MS, UNALP-ARIDA A, YEH M, MCCULLOUGH AJ, SANYAL AJ: Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **41**: 1313-1321, 2005.

- KREN BT, TREMBLEY JH, FAN G, STEER CJ: Molecular regulation of liver regeneration. *Ann N Y Acad Sci* **831**: 361-381, 1997.
- KUCERA O, CERVINKOVA Z: Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol* **20**: 8364-8376, 2014.
- KUČERA O, AL-DURY S, LOTKOVÁ H, ROUŠAR T, RYCHTRMOC D, ČERVINKOVÁ Z: Steatotic rat hepatocytes in primary culture are more susceptible to the acute toxic effect of acetaminophen. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* **61 Suppl 2**: S93-101, 2012.
- KUSHNAREVA Y, MURPHY AN, ANDREYEV A: Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* **368**: 545-553, 2002.
- LAI SS, ZHAO DD, CAO P, LU K, LUO OY, CHEN WB, LIU J, JIANG EZ, YU ZH, LEE G, LI J, YU DC, XU XJ, ZHU MS, GAO X, LI CJ, XUE B: PP2A α positively regulates the termination of liver regeneration in mice through the AKT/GSK3 β /Cyclin D1 pathway. *J Hepatol* **64**: 352-360, 2016.
- LANCASTER EM, HIATT JR, ZARRINPAR A: Acetaminophen hepatotoxicity: an updated review. *Arch Toxicol* **89**: 193-199, 2015.
- LATOUR I, DE ROS E, DENEJF, BUC CALDERON P: Protein S-thiolation can mediate the inhibition of protein synthesis induced by tert-butyl hydroperoxide in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **160**: 1-9, 1999.
- LECLERCQ IA, VANSTEENBERGHE M, LEBRUN VB, VANHUL NK, ABARCA-QUINONES J, SEMPOUX CL, PICARD C, STARKEL P, HORSMANS YL: Defective hepatic regeneration after partial hepatectomy in leptin-deficient mice is not rescued by exogenous leptin. *Lab Invest* **86**: 1161-1171, 2006.
- LECOUTER J, MORITZ DR, LI B, PHILLIPS GL, LIANG XH, GERBER HP, HILLAN KJ, FERRARA N: Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* **299**: 890-893, 2003.
- LEE GS, YAN JS, NG RK, KAKAR S, MAHER JJ: Polyunsaturated fat in the methionine-choline-deficient diet influences hepatic inflammation but not hepatocellular injury. *Journal of lipid research* **48**: 1885-1896, 2007.
- LEHMANN K, TSCHUOR C, RICKENBACHER A, JANG JH, OBERKOFER CE, TSCHOPP O, SCHULTZE SM, RAPTIS DA, WEBER A, GRAF R, HUMAR B, CLAVIEN PA: Liver failure after extended hepatectomy in mice is mediated by a p21-dependent barrier to liver regeneration. *Gastroenterology* **143**: 1609-1619 e1604, 2012.
- LEU JI, CRISSEY MA, CRAIG LE, TAUB R: Impaired hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy in insulin-like growth factor binding protein 1-deficient mice with defects in C/EBP β and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase regulation. *Mol Cell Biol* **23**: 1251-1259, 2003.
- LEUNG C, RIVERA L, FURNESS JB, ANGUS PW: The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**: 412-425, 2016.
- LIEBER CS, LEO MA, MAK KM, XU Y, CAO Q, REN C, PONOMARENKO A, DECARLI LM: Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* **79**: 502-509, 2004.

- LOW TY, LEOW CK, SALTO-TELLEZ M, CHUNG MC: A proteomic analysis of thioacetamide-induced hepatotoxicity and cirrhosis in rat livers. *Proteomics* **4**: 3960-3974, 2004.
- LU Y, CEDERBAUM AI: CYP2E1 potentiation of LPS and TNF α -induced hepatotoxicity by mechanisms involving enhanced oxidative and nitrosative stress, activation of MAP kinases, and mitochondrial dysfunction. *Genes Nutr* **5**: 149-167, 2010.
- MADESH M, BALASUBRAMANIAN KA: Activation of liver mitochondrial phospholipase A2 by superoxide. *Arch Biochem Biophys* **346**: 187-192, 1997.
- MACHADO M, CORTEZ-PINTO H: Non-alcoholic steatohepatitis and metabolic syndrome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **9**: 637-642, 2006.
- MACHADO MV, CORTEZ-PINTO H: Cell death and nonalcoholic steatohepatitis: where is ballooning relevant? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **5**: 213-222, 2011.
- MALAGUARNERA M, DI ROSA M, NICOLETTI F, MALAGUARNERA L: Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med (Berl)* **87**: 679-695, 2009.
- MANGIPUDY RS, CHANDA S, MEHENDALE HM: Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. *Environ Health Perspect* **103**: 260-267, 1995.
- MANTENA SK, VAUGHN DP, ANDRINGA KK, ECCLESTON HB, KING AL, ABRAMS GA, DOELLER JE, KRAUS DW, DARLEY-USMAR VM, BAILEY SM: High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. *Biochem J* **417**: 183-193, 2009.
- MARCHESINI G, BUGIANESI E, FORLANI G, CERRELLI F, LENZI M, MANINI R, NATALE S, VANNI E, VILLANOVA N, MELCHIONDA N, RIZZETTO M: Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* **37**: 917-923, 2003.
- MARTINS PN, THERUVATH TP, NEUHAUS P: Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int* **28**: 3-11, 2008.
- MATTEONI CA, YOUNOSSI ZM, GRAMLICH T, BOPARAI N, LIU YC, MCCULLOUGH AJ: Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* **116**: 1413-1419, 1999.
- MCCORMACK L, PETROWSKY H, JOCHUM W, FURRER K, CLAVIEN PA: Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. *Ann Surg* **245**: 923-930, 2007.
- MCGILL MR, SHARPE MR, WILLIAMS CD, TAHA M, CURRY SC, JAESCHKE H: The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *J Clin Invest* **122**: 1574-1583, 2012a.
- MCGILL MR, WILLIAMS CD, XIE Y, RAMACHANDRAN A, JAESCHKE H: Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **264**: 387-394, 2012b.

- MCMILLAN JM, JOLLOW DJ: Galactosamine hepatotoxicity: effect of galactosamine on glutathione resynthesis in rat primary hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* **115**: 234-240, 1992.
- MEHENDALE HM: Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury. *Toxicol Pathol* **33**: 41-51, 2005.
- MEI S, NI HM, MANLEY S, BOCKUS A, KASSEL KM, LUYENDYK JP, COPPLE BL, DING WX: Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **339**: 487-498, 2011.
- MELI R, MATTACE RASO G, CALIGNANO A: Role of innate immune response in non-alcoholic Fatty liver disease: metabolic complications and therapeutic tools. *Front Immunol* **5**: 177, 2014.
- MICHALOPOULOS GK: Liver regeneration. *J Cell Physiol* **213**: 286-300, 2007.
- MICHALOPOULOS GK: Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* **176**: 2-13, 2010.
- MICHALOPOULOS GK, DEFRANCES M: Liver regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **93**: 101-134, 2005.
- MICHALOPOULOS GK, DEFRANCES MC: Liver regeneration. *Science* **276**: 60-66, 1997.
- MICHALOPOULOS GK, KHAN Z: Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin. *Gastroenterology* **128**: 503-506, 2005.
- MICHAUT A, MOREAU C, ROBIN MA, FROMENTY B: Acetaminophen-induced liver injury in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int* **34**: e171-179, 2014.
- MOODY DE, JAMES JL, SMUCKLER EA: Phenobarbital pretreatment alters the localization of CCl₄-induced changes in rat liver microsomal fatty acids. *Toxicol Appl Pharmacol* **103**: 16-27, 1990.
- MORTENSEN KE, REVHAUG A: Liver regeneration in surgical animal models - a historical perspective and clinical implications. *Eur Surg Res* **46**: 1-18, 2011.
- MURATA H, YAGI T, IWAGAKI H, OGINO T, SADAMORI H, MATSUKAWA H, UMEDA Y, HAGA S, TAKAKA N, OZAKI M: Mechanism of impaired regeneration of fatty liver in mouse partial hepatectomy model. *J Gastroenterol Hepatol* **22**: 2173-2180, 2007.
- MURRAY AB, STRECKER W, SILZ S: Ultrastructural changes in rat hepatocytes after partial hepatectomy, and comparison with biochemical results. *J Cell Sci* **50**: 433-448, 1981.
- NAGARAJAN P, MAHESH KUMAR MJ, VENKATESAN R, MAJUNDAR SS, JUYAL RC: Genetically modified mouse models for the study of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG* **18**: 1141-1153, 2012.
- NAKATANI T, OZAWA K, ASANO M, UKIKUSA M, KAMIYAMA Y, TOBE T: Changes in predominant energy substrate after hepatectomy. *Life Sci* **28**: 257-264, 1981.
- NISHIHIRA T, TANAKA J, NISHIKAWA K, JIKKO A, TAKI Y, MORIMOTO T, KOIZUMI K, KAMIYAMA Y, OZAWA K, TOBE T: Biological significance of enhanced mitochondrial membrane potential in regenerating liver. *Hepatology* **6**: 220-224, 1986.

- NISHIKAWA Y, WANG M, CARR BI: Changes in TGF-beta receptors of rat hepatocytes during primary culture and liver regeneration: increased expression of TGF-beta receptors associated with increased sensitivity to TGF-beta-mediated growth inhibition. *J Cell Physiol* **176**: 612-623, 1998.
- NOHL H, GILLE L, STANIEK K: Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol* **69**: 719-723, 2005.
- OE S, LEMMER ER, CONNER EA, FACTOR VM, LEVEEN P, LARSSON J, KARLSSON S, THORGEIRSSON SS: Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration in mice. *Hepatology* **40**: 1098-1105, 2004.
- OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* **95**: 351-358, 1979.
- OHLSON LC, KOROXENIDOU L, HALLSTROM IP: Inhibition of in vivo rat liver regeneration by 2-acetylaminofluorene affects the regulation of cell cycle-related proteins. *Hepatology* **27**: 691-696, 1998.
- ORELLANA M, RODRIGO R, VARELA N, ARAYA J, PONIACHIK J, CSENDES A, SMOK G, VIDELA LA: Relationship between in vivo chlorzoxazone hydroxylation, hepatic cytochrome P450 2E1 content and liver injury in obese non-alcoholic fatty liver disease patients. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **34**: 57-63, 2006.
- PALMES D, SPIEGEL HU: Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* **25**: 1601-1611, 2004.
- PEGORIER JP, LE MAY C, GIRARD J: Control of gene expression by fatty acids. *J Nutr* **134**: 2444S-2449S, 2004.
- PEREZ-CARRERAS M, DEL HOYO P, MARTIN MA, RUBIO JC, MARTIN A, CASTELLANO G, COLINA F, ARENAS J, SOLIS-HERRUZO JA: Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **38**: 999-1007, 2003.
- PESSAYRE D: Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* **22 Suppl 1**: S20-27, 2007.
- PESSAYRE D, MANSOURI A, FROMENTY B: Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**: G193-199, 2002.
- PICARD C, LAMBOTTE L, STARKEL P, SEMPOUX C, SALIEZ A, VAN DEN BERGE V, HORSMANS Y: Steatosis is not sufficient to cause an impaired regenerative response after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* **36**: 645-652, 2002.
- PILZ J, MEINEKE I, GLEITER CH: Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* **742**: 315-325, 2000.
- POPELOVA O, STERBA M, SIMUNEK T, MAZUROVA Y, GUNCOVA I, HROCH M, ADAMCOVA M, GERSL V: Deferiprone does not protect against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **326**: 259-269, 2008.

- RANCHAL I, GONZALEZ R, LOPEZ-SANCHEZ LM, BARRERA P, LOPEZ-CILLERO P, SERRANO J, BERNARDOS A, DE LA MATA M, RODRIGUEZ-ARIZA A, MUNTANE J: The differential effect of PGE(1) on d-galactosamine-induced nitrosative stress and cell death in primary culture of human hepatocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **79**: 245-259, 2006.
- RAO MS, PAPREDDY K, ABECASSIS M, HASHIMOTO T: Regeneration of liver with marked fatty change following partial hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci* **46**: 1821-1826, 2001.
- RASHBA-STEP J, TATOYAN A, DUNCAN R, ANN D, PUSHPA-REHKA TR, SEVANIAN A: Phospholipid peroxidation induces cytosolic phospholipase A2 activity: membrane effects versus enzyme phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* **343**: 44-54, 1997.
- REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY GC, JR.: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**: 1939-1951, 1993.
- RICCI JE, WATERHOUSE N, GREEN DR: Mitochondrial functions during cell death, a complex (I-V) dilemma. *Cell Death Differ* **10**: 488-492, 2003.
- RIEHLE KJ, HAQUE J, MCMAHAN RS, KAVANAGH TJ, FAUSTO N, CAMPBELL JS: Sustained Glutathione Deficiency Interferes with the Liver Response to TNF-alpha and Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice. *J Liver Disease Transplant* **1**: 2013.
- RODRIGUEZ S, ANCHETA O, RAMOS ME, REMIREZ D, ROJAS E, GONZALEZ R: Effects of Cuban red propolis on galactosamine-induced hepatitis in rats. *Pharmacol Res* **35**: 1-4, 1997.
- ROLFE DF, HULBERT AJ, BRAND MD: Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta* **1188**: 405-416, 1994.
- ROLO AP, TEODORO JS, PALMEIRA CM: Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* **52**: 59-69, 2012.
- ROMESTAING C, PIQUET MA, BEDU E, ROULEAU V, DAUTRESME M, HOURMAND-OLLIVIER I, FILIPPI C, DUCHAMP C, SIBILLE B: Long term highly saturated fat diet does not induce NASH in Wistar rats. *Nutr Metab (Lond)* **4**: 4, 2007.
- ROUS P, LARIMORE LD: RELATION OF THE PORTAL BLOOD TO LIVER MAINTENANCE : A DEMONSTRATION OF LIVER ATROPHY CONDITIONAL ON COMPENSATION. *J Exp Med* **31**: 609-632, 1920.
- ROUŠAR T, KUČERA O, LOTKOVÁ H, ČERVINKOVÁ Z: Assessment of reduced glutathione: Comparison of an optimized fluorometric assay with enzymatic recycling method. *Analytical Biochemistry*: 2012.
- ROZGA J, JEPSSON B, BENGMARK S: Portal branch ligation in the rat. Reevaluation of a model. *Am J Pathol* **125**: 300-308, 1986.
- RUDNICK DA, DAVIDSON NO: Functional Relationships between Lipid Metabolism and Liver Regeneration. *Int J Hepatol* **2012**: 549241, 2012.

- RUSSELL WE, COFFEY RJ, JR., OUELLETTE AJ, MOSES HL: Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 5126-5130, 1988.
- RYCHTRMOC D, LIBRA A, BUNCEK M, GARNOL T, CERVINKOVA Z: Studying liver regeneration by means of molecular biology: how far we are in interpreting the findings? *Acta Medica (Hradec Kralove)* **52**: 91-99, 2009.
- SAKAMOTO T, LIU Z, MURASE N, EZURE T, YOKOMURO S, POLI V, DEMETRIS AJ: Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* **29**: 403-411, 1999.
- SANYAL AJ, CAMPBELL-SARGENT C, MIRSHAHI F, RIZZO WB, CONTOS MJ, STERLING RK, LUKETIC VA, SHIFFMAN ML, CLORE JN: Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* **120**: 1183-1192, 2001.
- SATO N: Central role of mitochondria in metabolic regulation of liver pathophysiology. *J Gastroenterol Hepatol* **22 Suppl 1**: S1-6, 2007.
- SERVIDDIO G, BELLANTI F, TAMBORRA R, ROLLO T, ROMANO AD, GIUDETTI AM, CAPITANIO N, PETRELLA A, VENDEMIALE G, ALTOMARE E: Alterations of hepatic ATP homeostasis and respiratory chain during development of non-alcoholic steatohepatitis in a rodent model. *Eur J Clin Invest* **38**: 245-252, 2008.
- SERVIDDIO G, BELLANTI F, VENDEMIALE G: FREE RADICAL BIOLOGY FOR MEDICINE: LEARNING FROM NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. *Free Radic Biol Med*: 2013.
- SHI J, AISAKI K, IKAWA Y, WAKE K: Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *Am J Pathol* **153**: 515-525, 1998.
- SCHOEN JM, WANG HH, MINUK GY, LAUTT WW: Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide* **5**: 453-464, 2001.
- SI-TAYEB K, LEMAIGRE FP, DUNCAN SA: Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell* **18**: 175-189, 2010.
- SIENDONES E, FOUAD D, DIAZ-GUERRA MJ, DE LA MATA M, BOSCA L, MUNTANE J: PGE1-induced NO reduces apoptosis by D-galactosamine through attenuation of NF-kappaB and NOS-2 expression in rat hepatocytes. *Hepatology* **40**: 1295-1303, 2004.
- SIMEK J, SEDLACEK J: Effect of glucose administered in vivo or in vitro on the respiratory quotient of rat liver tissue after partial hepatectomy. *Nature* **207**: 761-762, 1965.
- SIMEK J, SEDLACEK J: [The respiratory quotient of rat liver tissue following partial hepatectomy]. *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove* **9**: 405-411, 1966.
- SIMEONOVA PP, GALLUCCI RM, HULDERMAN T, WILSON R, KOMMINENI C, RAO M, LUSTER MI: The role of tumor necrosis factor-alpha in liver toxicity, inflammation, and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Toxicol Appl Pharmacol* **177**: 112-120, 2001.

- SOLTYS K, DIKDAN G, KONERU B: Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology* **34**: 13-18, 2001.
- STACHLEWITZ RF, SEABRA V, BRADFORD B, BRADHAM CA, RUSYN I, GERMOLEC D, THURMAN RG: Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells. *Hepatology* **29**: 737-745, 1999.
- STEER CJ: Liver regeneration. *FASEB J* **9**: 1396-1400, 1995.
- STOPPELER S, PALMES D, FEHR M, HOLZEN JP, ZIBERT A, SIAJ R, SCHMIDT HH, SPIEGEL HU, BAHDE R: Gender and strain-specific differences in the development of steatosis in rats. *Lab Anim* **47**: 43-52, 2013.
- STREETZ KL, LUEDDE T, MANNS MP, TRAUTWEIN C: Interleukin 6 and liver regeneration. *Gut* **47**: 309-312, 2000.
- SVATKOVA R, CERVINKOVA Z, KALOUS M, RAUCHOVA H, DRAHOTA Z: Respiratory control index of mitochondria isolated from regenerating rat liver. *Physiol Res* **45**: 249-252, 1996.
- SYDOR S, GU Y, SCHLATTJAN M, BECHMANN LP, RAUEN U, BEST J, PAUL A, BABA HA, SOWA JP, GERKEN G, CANBAY A: Steatosis does not impair liver regeneration after partial hepatectomy. *Lab Invest* **93**: 20-30, 2013.
- ŠTÍPEK S (2000) In: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci, pp 1-320. Praha: Grada.
- TARGHER G, BERTOLINI L, RODELLA S, ZOPPINI G, SCALA L, ZENARI L, FALEZZA G: Associations between plasma adiponectin concentrations and liver histology in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* **64**: 679-683, 2006.
- TAUB R: Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *FASEB J* **10**: 413-427, 1996.
- TAUB R: Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 836-847, 2004.
- TILG H: The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* **28**: 179-185, 2010.
- TOMIYA T, OGATA I, YAMAOKA M, YANASE M, INOUE Y, FUJIWARA K: The mitogenic activity of hepatocyte growth factor on rat hepatocytes is dependent upon endogenous transforming growth factor- α . *Am J Pathol* **157**: 1693-1701, 2000.
- TURNER N, BRUCE CR, BEALE SM, HOEHN KL, SO T, ROLPH MS, COONEY GJ: Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. *Diabetes* **56**: 2085-2092, 2007.
- VAN DEN BROEK MA, OLDE DAMINK SW, DEJONG CH, LANG H, MALAGO M, JALAN R, SANER FH: Liver failure after partial hepatic resection: definition, pathophysiology, risk factors and treatment. *Liver Int* **28**: 767-780, 2008.
- VENDEMIALE G, GRATTAGLIANO I, CARACENI P, CARACCIO G, DOMENICALI M, DALL'AGATA M, TREVISANI F, GUERRIERI F, BERNARDI M,

- ALTOMARE E: Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* **33**: 808-815, 2001.
- VERNON G, BARANOVA A, YOUNOSSI ZM: Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* **34**: 274-285, 2011.
- VETELAINEN R, BENNINK RJ, VAN VLIET AK, VAN GULIK TM: Mild steatosis impairs functional recovery after liver resection in an experimental model. *Br J Surg* **94**: 1002-1008, 2007a.
- VETELÄINEN R, VAN VLIET A, VAN GULIK TM: Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *Journal of gastroenterology and hepatology* **22**: 1526-1533, 2007.
- VETELAINEN R, VAN VLIET AK, VAN GULIK TM: Severe steatosis increases hepatocellular injury and impairs liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy. *Ann Surg* **245**: 44-50, 2007b.
- VIDELA LA, RODRIGO R, ORELLANA M, FERNANDEZ V, TAPIA G, QUINONES L, VARELA N, CONTRERAS J, LAZARTE R, CSENDES A, ROJAS J, MALUENDA F, BURDILES P, DIAZ JC, SMOK G, THIELEMANN L, PONIACHIK J: Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci (Lond)* **106**: 261-268, 2004.
- WANG B, ZHAO L, FISH M, LOGAN CY, NUSSE R: Self-renewing diploid Axin2(+) cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature* **524**: 180-185, 2015.
- WEBER LW, BOLL M, STAMPFL A: Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* **33**: 105-136, 2003.
- WEI W, DIRSCH O, MCLEAN AL, ZAFARNIA S, SCHWIER M, DAHMEN U: Rodent models and imaging techniques to study liver regeneration. *Eur Surg Res* **54**: 97-113, 2015.
- WEINBREN K, TARSH E: THE MITOTIC RESPONSE IN THE RAT LIVER AFTER DIFFERENT REGENERATIVE STIMULI. *Br J Exp Pathol* **45**: 475-480, 1964.
- XU Z-J, FAN J-G, DING X-D, QIAO L, WANG G-L: Characterization of high-fat, diet-induced, non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats. *Digestive diseases and sciences* **55**: 931-940, 2010.
- YANG MC, CHANG CP, LEI HY: Induction of liver fibrosis in a murine hepatoma model by thioacetamide is associated with enhanced tumor growth and suppressed antitumor immunity. *Lab Invest* **90**: 1782-1793, 2010.
- YANG S, TAN TM, WEE A, LEOW CK: Mitochondrial respiratory function and antioxidant capacity in normal and cirrhotic livers following partial hepatectomy. *Cell Mol Life Sci* **61**: 220-229, 2004.
- YANG S, ZHU H, LI Y, LIN H, GABRIELSON K, TRUSH MA, DIEHL AM: Mitochondrial adaptations to obesity-related oxidant stress. *Arch Biochem Biophys* **378**: 259-268, 2000.
- YOUNOSSI ZM, KOENIG AB, ABDELATIF D, FAZEL Y, HENRY L, WYMER M: Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* **64**: 73-84, 2016.

- YU J, MARSH S, HU J, FENG W, WU C: The Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Genetic Background. *Gastroenterol Res Pract* **2016**: 2862173, 2016.
- YUAN L, KAPLOWITZ N: Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med* **30**: 29-41, 2009.
- ZHANG BH, WELTMAN M, FARRELL GC: Does steatohepatitis impair liver regeneration? A study in a dietary model of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* **14**: 133-137, 1999.
- ZIMMERMANN A: Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant* **19 Suppl 4**: iv6-10, 2004.